

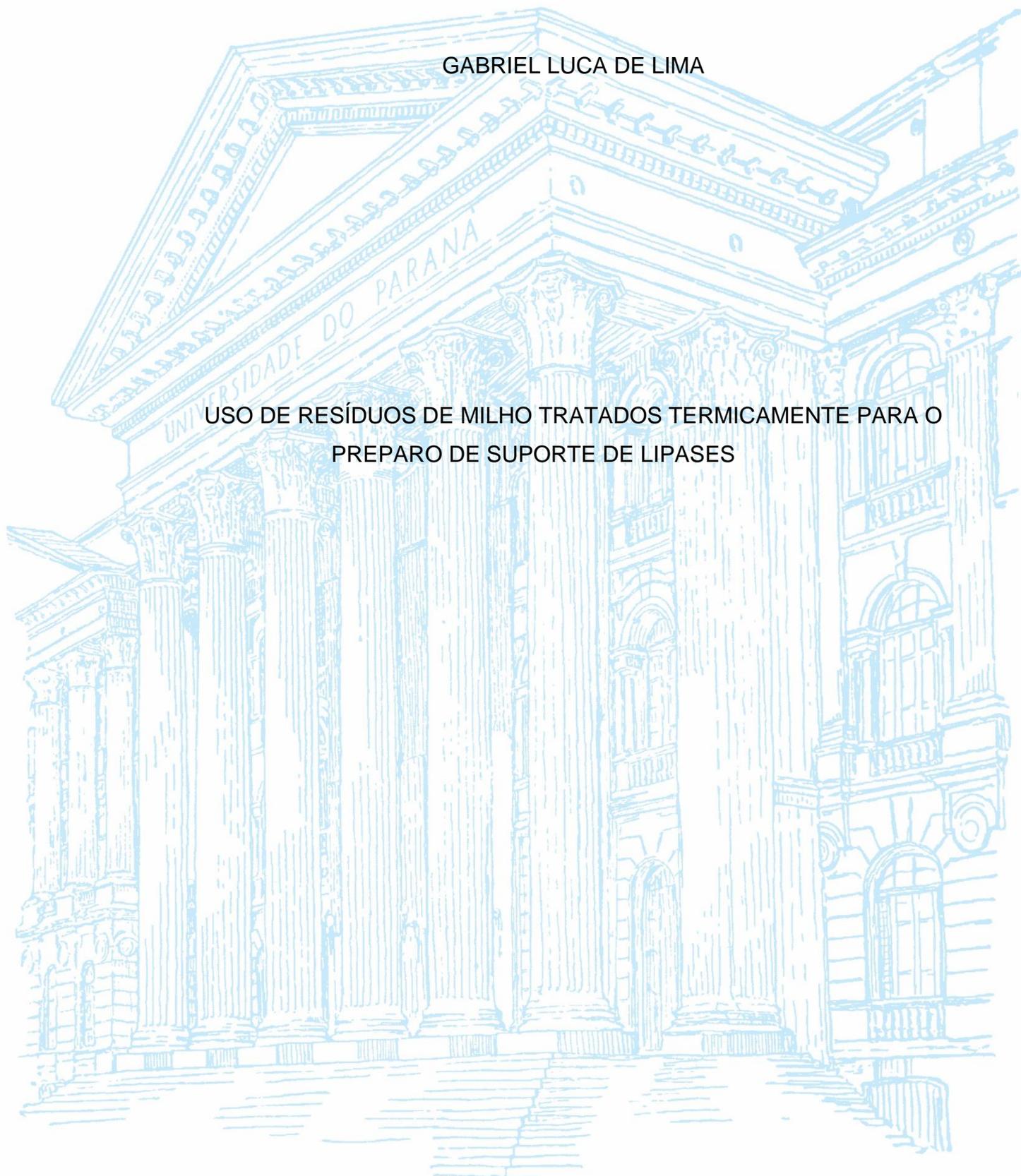
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GABRIEL LUCA DE LIMA

USO DE RESÍDUOS DE MILHO TRATADOS TERMICAMENTE PARA O
PREPARO DE SUPORTE DE LIPASES

PALOTINA

2022



GABRIEL LUCA DE LIMA

USO DE RESÍDUOS DE MILHO TRATADOS TERMICAMENTE PARA O
PREPARO DE SUPORTE DE LIPASES

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Isac G. Rosset

PALOTINA

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ATA DE REUNIÃO

Aos seis dias do mês de maio do ano de dois mil e vinte e dois, às dezenove horas e trinta minutos, na Sala 20, Bloco Didático IV, Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, realizou-se a Defesa Pública e Oral do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado "Uso de Resíduos de Milho Tratados Termicamente para o Preparo de Suporte de Lipases" apresentado pelo discente Gabriel Luca de Lima, orientado pelo Prof. Dr. Isac George Rosset, como um dos requisitos obrigatórios para conclusão do curso de graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Iniciados os trabalhos, o orientador e Presidente da Banca concedeu a palavra ao discente, para exposição do seu trabalho. A seguir, foi concedida a palavra em ordem sucessiva aos membros da Banca de Exame, os quais passaram a arguir o discente. Ultimada a defesa, que se desenvolveu nos termos normativos, a Banca de Exame, em sessão secreta, passou aos trabalhos de julgamento, tendo atribuído ao discente as seguintes notas: **Prof. Dr. Isac George Rosset, nota: cem (cem)**, **Profa. Dra. Adriana Ferla de Oliveira, nota: 100 (cem)**, e **Profa. Dra. Raquel Stroher, nota: 100 (cem)**. A nota final do discente, após a média aritmética dos três membros da banca de exame, foi **100 (cem)**. As considerações e sugestões feitas pela Banca de Exame deverão ser atendidas pelo discente sob acompanhamento de seu orientador. Nada mais havendo a tratar foi lavrada a presente ata, que, lida e aprovada, vai por todos assinada eletronicamente.



Documento assinado eletronicamente por **ISAC GEORGE ROSSET, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 06/05/2022, às 21:21, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **RAQUEL STROHER, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 06/05/2022, às 21:22, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **ADRIANA FERLA DE OLIVEIRA, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 06/05/2022, às 21:23, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador **4461235** e o código CRC **FCE44BB7**.

A Deus.

Aos meus pais, Verônica e Luca.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar, iluminar e ajudar a superar as dificuldades. Sem ele nada seria possível.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Isac G. Rosset, pela orientação, apoio e por me proporcionar a chance da elaboração deste trabalho. Agradeço também por cada conselho dado e por ter se tornado meu amigo durante a minha trajetória na universidade.

Aos meus pais, Verônica e Luca, por sempre me incentivarem a estudar, por todo apoio, carinho e amor. Obrigado por tudo que fizeram, pelas lutas diárias e pela criação que me deram, uma honra ser filho de vocês.

A minha namorada, Michely, pela paciência, por me apoiar e sempre acreditar em mim mesmo quando eu não acreditava. Meus dias se tornaram melhores depois que você entrou na minha vida.

Aos amigos que fiz na universidade, obrigado pelo apoio demonstrado ao longo de toda a graduação.

A Universidade Federal do Paraná do Setor Palotina e ao curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, que me permitiu adquirir amplos conhecimentos através da sua infraestrutura como um todo.

Aos meus professores, obrigado a todos pela receptividade e por todo conhecimento compartilhado

Aos técnicos do Bloco da Química, obrigado pela disposição e prestatividade.

Ao Grupo de Pesquisa em Química Orgânica, Biológica e Computacional, obrigado pelo companheirismo.

No mais, agradeço a Fundação Araucária pelo apoio financeiro para colaborar com o desenvolvimento deste projeto e a todos que de alguma forma colaboraram com meu crescimento acadêmico, pessoal e profissional.

Eterna gratidão a todos.

RESUMO

A geração de resíduos no sistema de produção agrícola é responsável por causar grandes impactos ao meio ambiente, podendo alterar todo o ecossistema quando não tratados corretamente. Fator que determina a manipulação destes, uma questão de preocupação mundial. Por outro lado, a problemática da utilização de enzimas solúveis devido a sua instabilidade, principalmente quando se trata de reutilização, faz com que a busca por suportes alternativos para imobilização enzimática motive diversos estudos na área de biotecnologia/enzimologia. Devido a importância desses fatores, este trabalho estudou a utilização de resíduos de colheita de milho (palha e caule), tratados termicamente para o preparo de suporte de lipases, visando analisar a afinidade enzimática pelo material orgânico. Para isso, foram coletados as palhas e os caules da planta, resíduos provenientes da colheita, na cidade de Guaíra – PR. As mesmas foram preparadas e submetidas a diferentes conjuntos de tratamentos térmicos. Posteriormente, foram realizados testes de imobilização em meio líquido com diferentes lipases. Dentre as enzimas estudadas, a lipase de *Pseudomonas fluorescens* foi a que apresentou resultados mais promissores tendo afinidade pela maioria dos suportes a base de palha e caule de milho propostos, apresentando um rendimento de imobilização de aproximadamente 73,75 % pelo suporte a base de palha. Além disso, a partir da mesma enzima imobilizada obteve-se um rendimento de esterificação do ácido oleico de 80,51 %, mantendo sua atividade mesmo após 3 ciclos reacionais. Para realizar a caracterização dos suportes sintetizados, foram realizadas análises de espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier no modo de reflexão total atenuada (ATR), no qual permitiu identificar os grupos funcionais presentes no material.

Palavras-chave: Suportes orgânicos; Imobilização enzimática; Biotecnologia.

ABSTRACT

The generation of waste in the agricultural production system is responsible for causing major impacts to the environment, and can change the entire ecosystem when not treated correctly. Factor that determines the manipulation of these, a matter of global concern. On the other hand, the problematic use of soluble enzymes due to their instability, especially when it comes to reuse, makes the search for alternative supports for enzymatic immobilization motivate several studies in the area of biotechnology/enzymology. Due to the importance of these factors, this work studied the use of heat treated corn residues for the preparation of lipase support, aiming to analyze the enzymatic affinity for the organic material. For this, the stover and stalks of the plant were collected, residues from the harvest, in the city of Guaira - PR. They were prepared and submitted to different sets of heat treatments. Subsequently, immobilization tests were performed in liquid medium with different lipases. Among the enzymes studied, the lipase from *Pseudomonas fluorescens* was the one that showed the most promising results, having affinity for most of the proposed corn straw and stem supports, presenting an immobilization yield of approximately 52.4 % by the straw based support. Furthermore, from the same immobilized enzyme, an esterification yield of oleic acid of 80.51% was obtained, maintaining its activity even after 3 reaction cycles. In order to characterize the synthesized supports, absorption spectroscopy analyzes were carried out in the infrared region with Fourier transform in attenuated total reflection (ATR) mode, which allowed the identification of the functional groups present in the material.

Keywords: Organic supports; Enzymatic immobilization; Biotechnology.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESQUEMA GERAL DA REAÇÃO DE CATÁLISE ENZIMÁTICA.....	15
FIGURA 2 - MECANISMO DE ATIVAÇÃO INTERFACIAL DE LIPASES.	17
FIGURA 3 - MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS.	19
FIGURA 4 – CARACTERÍSTICAS DESEJÁVEIS PARA OS SUPORTES.....	20
FIGURA 5 - PARTES DE UMA GRAMÍNEA GENÉRICA.....	22
FIGURA 6 - LOCAL DE COLETA DO RESÍDUO.....	25
FIGURA 7 – ESQUEMA DO PROCESSO DE PREPARO DO MATERIAL.....	26
FIGURA 8 – MATERIAL APÓS AS ETAPAS DE SEPARAÇÃO.....	27
FIGURA 9 – MATERIAL APÓS AS ETAPAS DE MOAGEM E PENERIAMENTO. ...	28
FIGURA 10 – ESQUEMA GERAL DOS TRATAMENTOS TÉRMICOS.	29
FIGURA 11 – METODOLOGIA PARA A PREPARAÇÃO DO SUPORTE.....	30
FIGURA 12 – Esquema reacional do método de Folin Lowry.	33
FIGURA 13 – REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO DO ÁCIDO OLEICO.....	33
FIGURA 14 – CADINHOS PREPARADOS PARA A PRIMEIRA ETAPA DO TRATAMENTO TÉRMICO.	39
FIGURA 15 – AMOSTRAS APÓS A SEGUNDA QUEIMA DO CONJUNTO DE TRATAMENTOS (400 – 500 °C).....	40
FIGURA 16 – CROMATOGRAFIA EM CAMADA FINA DA CATALISE DO ÁCIDO OLEICO.....	46
FIGURA 17 – RENDIMENTO DAS REAÇÕES CATALISADAS POR P. FLUORESCENS	48
FIGURA 18 - ESPECTRO DE ATR PARA A PALHA E CAULE IN NATURA.	49
FIGURA 19 – ESPECTRO DE ATR PARA OS TRATAMENTOS TÉRMICOS DA PALHA.	50
FIGURA 20 – ESPECTRO DE ATR PARA OS TRATAMENTOS TÉRMICOS DO CAULE.	51
FIGURA 21 – ESPECTRO DE ATR PARA AS IMOBILIZAÇÕES DA LIPASE DE P. FLUORESCENS EM PALHA.	53
FIGURA 22 – ESPECTRO DE ATR PARA AS IMOBILIZAÇÕES DA LIPASE DE P. FLUORESCENS EM CAULE.	54

LISTA DE GRÁFICOS

GRAFICO 1 – CURVA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO ENZIMÁTICA.	42
GRAFICO 2 – CARACTERIZAÇÃO DOS SOBRENADANTES DA IMOBILIZAÇÃO DE <i>P. FLUORESCENS</i> EM TODOS OS SUPORTES.	43
GRAFICO 3 – RENDIMENTO DAS REUTILIZAÇÕES DE <i>P. FLUORESCENS</i> EM SUPORTE PALHA 300 – 400 °C KOH.....	47

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – CLASSIFICAÇÃO DAS ENZIMAS NO SISTEMA EC.....	16
TABELA 2 – MASSAS DE ENZIMAS, SUPORTE E VOLUME DE TAMPÃO UTILIZADOS NA REAÇÃO DE IMOBILIZAÇÃO.....	31
TABELA 3 – COMPOSIÇÃO DO MEIO REACIONAL PARA OS TESTES DE CATALISE DOS SUPORTES.....	35
TABELA 4 – VARIAÇÕES DE MASSAS OBTIDAS PARA O CONJUNTO DE TRATAMENTO TÉRMICO 300 – 400 °C.	38
TABELA 5 – VARIAÇÕES DE MASSAS OBTIDAS PARA O CONJUNTO DE TRATAMENTO TÉRMICO 400 – 500 °C.	40
TABELA 6 – VARIAÇÕES DE MASSAS OBTIDAS PARA O CONJUNTO DE TRATAMENTO TÉRMICO 500 – 600 °C.	41
TABELA 7 – ABSORBÂNCIAS DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE <i>P. FLUORESCENS</i> EM TAMPÃO FOSFATO.	42
TABELA 8 – TITULAÇÃO DO ETANOL ABSOLUTO.	44
TABELA 9 – RENDIMENTO DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO DO ÁCIDO OLEICO CATALISADA PELOS SUPORTES.	45
TABELA 10 – RENDIMENTO DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO DO ÁCIDO OLEICO CATALISADA POR LIPASES.....	45
TABELA 11 – RENDIMENTO DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO DO ÁCIDO OLEICO CATALISADA PELOS SUPORTES.....	49
TABELA 12 – PRINCIPAIS BANDAS APRESENTADAS NO ESPECTRO PARA PALHA E CAULA IN NATURA.....	50
TABELA 13 – PRINCIPAIS BANDAS APRESENTADAS NO ESPECTRO PARA OS TRATAMENTOS TÉRMICOS DA PALHA.....	51
TABELA 14 – PRINCIPAIS BANDAS APRESENTADAS NO ESPECTRO PARA OS TRATAMENTOS TÉRMICOS DA PALHA.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

CALB	–	<i>Candida antartica tipo B</i>
°C	–	Graus Celsius
min	–	minutos
mL	–	Mililitros
mg	–	Miligramas
nm	–	Nanômetro
pH	–	Potencial hidrogeniônico
RPM	–	Rotações por minutos

LISTA DE SÍMBOLOS

®	–	Marca registrada
™	–	Marca comercial
μ	–	micro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	JUSTIFICATIVA	14
1.2	OBJETIVO.....	14
1.2.1	Objetivos específicos.....	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	ENZIMAS	15
2.2	LIPASES	16
2.2.1	Mecanismo de funcionamento das lipases.....	17
2.3	IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA	18
2.3.1	Métodos de imobilização	19
2.3.2	Suportes para imobilização enzimática	20
2.4	O MILHO	21
2.4.1	Mercado nacional de grãos	23
2.4.2	A problemática ambiental da superprodução agrícola.....	23
3	MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1	MATERIAL	25
3.1.1	Enzimas.....	25
3.1.2	Reagentes	26
3.1.3	Equipamentos.....	26
3.2	METODOLOGIA.....	26
3.2.1	Preparo do material	26
3.2.2	Tratamento térmico e químico	28
3.2.3	Imobilização enzimática	30
3.2.4	Síntese do oleato de etila via esterificação catalisada por lipases	33
3.2.5	Síntese do oleato de etila via esterificação catalisada pelos suportes a base de milho.....	34

3.2.6	Caracterização dos suportes.....	36
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	38
4.1	TRATAMENTO TÉRMICO E QUÍMICO.....	38
4.2	IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA.....	42
4.3	RENDIMENTO DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO.....	44
4.4	CARACTERIZAÇÃO DOS SUPORTES.....	49
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
	REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

As lipases são biocatalisadores que têm atraído a atenção das indústrias ao longo dos anos devido as suas propriedades únicas, como: estabilidade, seletividade e especificidade ao substrato (SARMAH *et al.*, 2017). Com uma vasta gama de aplicações, são enzimas consideradas muito versáteis e amplamente utilizadas na indústria, sendo que em 2017 o mercado mundial de enzimas era responsável por US\$ 7,1 bilhões, com estimativa de alcançar US\$ 10,5 bilhões em 2024 (DENTI, 2021).

Ressalta-se que, a utilização de enzimas livres ou solúveis a nível industrial é problemática. Devido à dificuldade de recuperação e reutilização, bem como a baixa estabilidade operacional atrelada ao alto custo de aquisição torna a utilização da mesma economicamente inviável (FILHO; SILVA e GUIDINI, 2019).

Alternativamente, surge a imobilização enzimática, uma técnica que possibilita a retenção de biomoléculas em um suporte sólido, com capacidade de reduzir as limitações da aplicação de enzimas livres, ajudando na preservação da seletividade, atividade e estabilidade, além da possibilidade de separação, recuperação, reutilização e aplicação em processos contínuos (CHANDRA *et al.*, 2020).

Frequentemente, materiais sintéticos e não biodegradáveis são utilizados como suportes para a imobilização de enzimas, trazendo consigo consequências para o meio ambiente após sua utilização. Entretanto, os materiais lignocelulósicos apresentam grande potencial como suporte para imobilização de enzimas, devido a disponibilidade abundante como subprodutos agroindustriais e baixo valor econômico (COSTA *et al.*, 2014).

A cadeia produtiva agropecuária brasileira é significativamente expressiva e atrelado a uma grande produção agrícola, está uma grande geração de resíduos em potencial. Esses, por sua vez, são principalmente constituídos de lignina e celulose. Além de outros compostos como a hemicelulose, lipídeos, proteínas, açúcares, amido, hidrocarbonetos, e vários outros compostos contendo uma diversidade de grupos funcionais (SUD, MAHAJAN e KAUR, 2008).

A partir do grande interesse industrial na área de tecnologia enzimática para a implementação dos princípios da química verde, o objetivo do presente estudo consiste em avaliar o uso de resíduos de milho tratados termicamente como material

alternativo ao suporte de lipases, bem como os fatores que envolvem a interação entre o material lignocelulósico e a proteína de interesse.

1.1 JUSTIFICATIVA

A justificativa da presente proposta se fundamenta em uma problemática ambiental, acerca da expressiva geração de resíduos agrícolas.

Para isso o estudo delineou-se no aproveitamento da palha e do caule residual de culturas de milho (resíduos lignocelulósicos), como uma forma de reduzir os danos causados ao meio ambiente, se tornando uma matéria-prima na produção de novos materiais de alto desempenho e alto valor agregado e uma aplicação comercial/industrial promissora.

Além disso, o interesse em tecnologias sustentáveis tem tornado os suportes enzimáticos à base de carbono promissores devido à natureza neutra e biodegradável e à estabilidade térmica e química. A funcionalização relativamente fácil dessas estruturas as torna muito adequadas para ligação da enzima ao suporte (NEMATIAN et al., 2020), essencial para aplicações biotecnológicas.

1.2 OBJETIVO

Avaliar a aplicação de resíduos de milho (palha e caule), tratados termicamente, como suporte na imobilização de lipases bem como a afinidade da interação entre os mesmos.

1.2.1 Objetivos específicos

- Estudar o comportamento do material quando submetido a diferentes tratamentos térmicos (300 e 400 °C, 400 e 500 °C, e 500 e 600 °C);
- Estudar o comportamento do material quando submetido a um tratamento químico com hidróxido de potássio em solução;
- Avaliar a afinidade do complexo enzima – suporte;
- Realizar testes catálise enzimática utilizando o material proposto como suporte.
- Caracterizar os suportes obtidos antes e após as imobilizações.

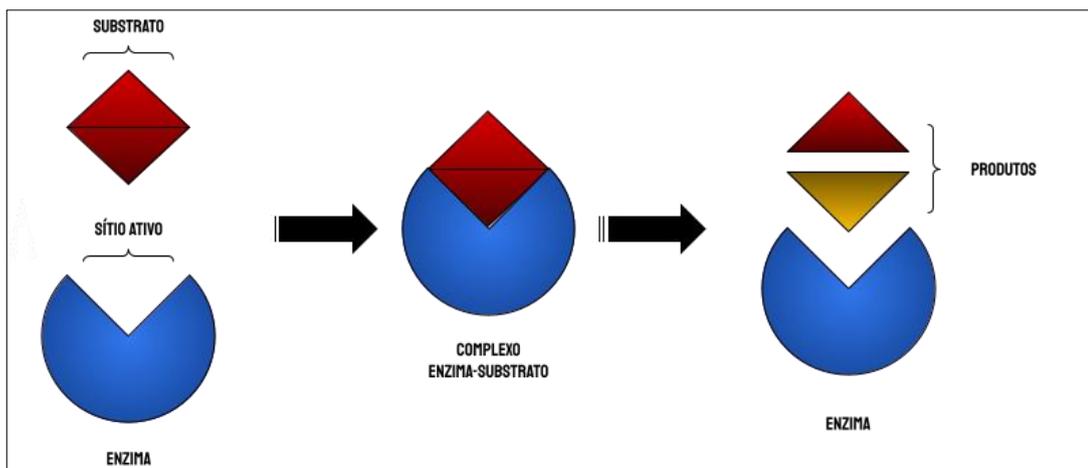
2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ENZIMAS

Enzimas são catalisadores biológicos que podem ser definidas como proteínas responsáveis pelo controle metabólico celular. Assim, como os demais catalisadores, são especializadas na aceleração de reações químicas e atuam aumentando a taxa das reações sem alterar o seu equilíbrio e sem serem consumidas (PINTO, F. T. R., 2018 e REIS, 2020).

A catálise enzimática pode ser explicada pela afinidade do substrato com o sítio ativo da enzima, que se ligam formando um complexo denominado “enzima-substrato”. A reação então ocorre, o substrato é convertido em produto e liberado do complexo (SOUZA *et al.*, 2017). Conforme apresentado na Figura 1.

FIGURA 1 - ESQUEMA GERAL DA REAÇÃO DE CATÁLISE ENZIMÁTICA.



FONTE: O autor (2022).

As enzimas são catalisadores versáteis, existindo, em geral, um processo enzimático equivalente para cada tipo de reação orgânica (MESQUITA *et al.*, 2018), Classificadas de acordo com a reação que elas catalisam, conforme a Tabela 1.

Cada enzima possui um código identificador único do tipo EC. 1.2.3.4, em que “EC” faz referência a Comissão de Enzimas (*Enzyme Commission*) do Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NCIUBMB). O primeiro dígito corresponde às diferentes classes, como observado na tabela anterior, por exemplo, as hidrolases possuem o dígito identificador EC 3. Já os

números seguintes identificam o substrato envolvido e o número de catálogo respectivamente (REIS, 2020).

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO DAS ENZIMAS NO SISTEMA EC.

Primeiro dígito EC	Classe das enzimas	Tipo de reação catalisada
1	Oxirredutases	Oxidação-redução
2	Transferases	Transferência de átomo/grupo funcional entre duas moléculas
3	Hidrolases	Hidrólise
4	Liases	Remoção de grupos funcionais
5	Isomerases	Isomerização
6	Ligases	União de duas moléculas, juntamente com a degradação de uma ligação fosfatada
7	Translocases	Movimentação ou separação de íons ou moléculas

FONTE: Adaptado de PINTO, F. T. R, (2018) e REIS (2020).

O alvo de estudo neste trabalho foram as lipases (hidrolases), que são uma ampla classe enzimática, responsáveis por catalisar a hidrólise de ligações éster-carboxílicas (SANTOS; SALGADO; VANETTI, 2021).

2.2 LIPASES

As lipases, por definição, triacilglicerol acil hidrolase (EC 3.1.1.3), são enzimas hidrolíticas capazes de realizar a catálise total ou hidrólise parcial de gorduras e óleos, tendo como produtos os ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol (BALDO *et al.*, 2020). Além disso, em determinadas condições específicas, podem catalisar reações de esterificação, transesterificação (acidólise, interesterificação, alcoólise), aminólise e epoxidação (QUAYSON *et al.* 2020).

Historicamente, as lipases eram obtidas principalmente de glândulas de animais (SILVA, 2014). Porém, diversos estudos trazem origens alternativas para enzimas como as plantas, fungos e bactérias (FILHO, SILVA e GUIDINI, 2019). Sendo que as provenientes de fontes microbianas, tem-se destacado pela versatilidade e facilidade de produção em larga escala, em especial, as de origem de bactérias do gênero *Pseudomonas*, devido ao seu baixo custo e grande disponibilidade comercial (REIS, 2020).

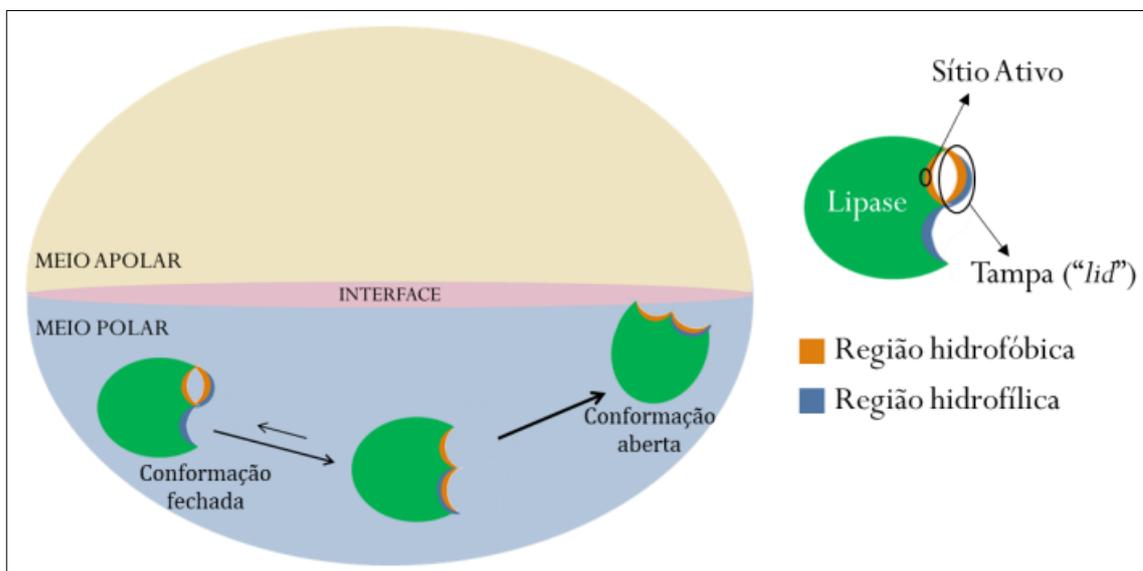
2.2.1 Mecanismo de funcionamento das lipases

A estrutura tridimensional da enzima, mais precisamente o seu sítio ativo, apresenta um padrão conformacional comum definido como α/β , caracterizado pela tríade catalítica composta de serina (ser), histidina (his) e ácido glutâmico/aspártico (Asp/Glu). Essa conformação é responsável pelo mecanismo de ativação interfacial da enzima, que pode diferir do modelo clássico de Michaelis-Menten (PINTO, G. C., 2018).

A ativação da interface das lipases ocorre em virtude da interação do meio reacional com o oligo-peptídeo anfifílico presente na estrutura dessas proteínas denominado *lid*, uma estrutura α -hélice também conhecida como tampa. Quando em meios aquosos, com ausência de solventes, os sítios ativos apresentam uma conformação fechada, nessas condições a α -hélice cobre o sítio ativo e impede o acesso ao substrato (SILVA, 2014).

Já a conformação aberta da enzima ocorre em contato com uma interface óleo-água, devido ao seu caráter estrutural, a tampa se desloca expondo o sítio ativo enzimático alterando a forma fechada da enzima para a forma aberta, deixando o sítio ativo acessível ao substrato, expondo a superfície de caráter hidrofóbico, permitindo assim a interação enzima-substrato (REIS, 2020). Conforme representado na Figura 2.

FIGURA 2 - MECANISMO DE ATIVAÇÃO INTERFACIAL DE LIPASES.



FONTE: REIS (2020).

Diante disso, as lipases atuam preferencialmente em meios reacionais que proporcionam interfaces água-óleo, ou água-solvente orgânico, pois na presença de substratos emulsionados, há um aumento da atividade lipolítica (BRITO, 2020).

De acordo com Jaeger, Dijkstra e Reetz (1999), o mecanismo de hidrólise pode ser dividido em quatro principais etapas, sendo elas:

- a) Ligação de hidrogênio com uma histidina adjacente, ativando o grupamento hidroxila da serina. Ocorre então o ataque nucleofílico ao carbono carboxílico da ligação éster da cadeia do substrato, formando um intermediário tetraédrico;
- b) Liberação de uma molécula de álcool, pela interação da histidina, formando um complexo acil-enzima;
- c) O componente ácido presente no complexo é então esterificado com o resíduo de serina, que desencadeia um segundo ataque nucleofílico ao substrato;
- d) O resíduo de histidina doa um próton ao átomo de oxigênio do resíduo de serina ativo, a ligação éster entre a serina e o componente acil é quebrada e o ácido graxo liberado, regenerando a enzima

2.3 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

Diante aos catalisadores químicos convencionais, as enzimas possuem muitas vantagens que tornam a sua aplicação em grande escala algo de grande interesse industrial. Porém, a sua utilização de forma solúvel, ou livre, envolve uma série de problemas como: o alto custo na produção, dificuldade de separação do meio reacional, além de apresentar uma instabilidade estrutural, que diminui sua capacidade catalítica devido às condições do processo, podendo ocorrer a inibição do substrato e conseqüentemente do produto (SOUZA *et al.* 2017).

Diante o exposto, o uso de enzimas de forma livre se torna inviável à escala industrial, sendo necessário métodos diferentes para sua aplicação. Surge então como alternativa, e utilização de enzimas imobilizadas (FILHO, SILVA e GUIDINI, 2019).

A imobilização é um termo genérico utilizado para representar a interação de um alvo de origem biológica (enzima, anticorpos ou outras biomoléculas) na superfície

de uma matriz insolúvel (suporte). Técnica aplicada em diversas áreas industriais e de grande interesse biotecnológico (FURLANI *et al.*, 2020; MESQUITA *et al.*, 2018).

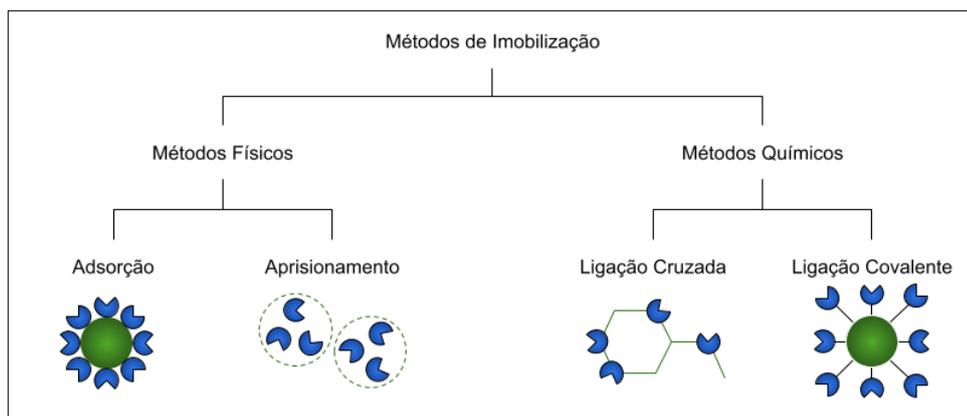
Dessa maneira, a vida útil do catalisador é prolongada, possibilitando o uso mais eficiente por meio de reutilização, reativação após exaustão parcial da sua atividade, facilidade de separação do produto final, estabilidade a faixas de pH e temperatura em processos biocatalíticos, remoção de enzima caso o processo seja por etapas, tornando o processo mais vantajoso em escala industrial (MESQUITA *et al.*, 2018; PINTO, G. C., 2018).

Uma etapa muito importante para que a imobilização seja eficiente é a escolha do método a ser utilizado. Esse que desempenha o papel mais importante na determinação da atividade enzimática, bem como das características particulares de cada reação (PINTO, F. T. R., 2018).

2.3.1 Métodos de imobilização

As enzimas livres podem ser imobilizadas de vários modos, que podem ser divididos em dois grandes grupos: os métodos físicos e os métodos químicos (TANIGUCHI, 2017). Conforme representado na Figura 3.

FIGURA 3 - MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS.



FONTE: O autor (2022).

De maneira geral, os métodos físicos apresentam como características interações mais fracas, como ligações de hidrogênio, por afinidade, forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas e ligação iônica entre a enzima e o suporte. Já nos métodos químicos, estão envolvidas principalmente a formação de ligações

covalentes, caracterizadas como ligações fortes, obtidas a partir das interações de éter, tio-éter, amida ou carbamato entre a enzima e o suporte escolhido, ou ainda por meio de ligações cruzadas, onde as proteínas são imobilizadas diretamente a um agente reticulante (PINTO, F. T. R., 2018; FURLANI *et al.*, 2020).

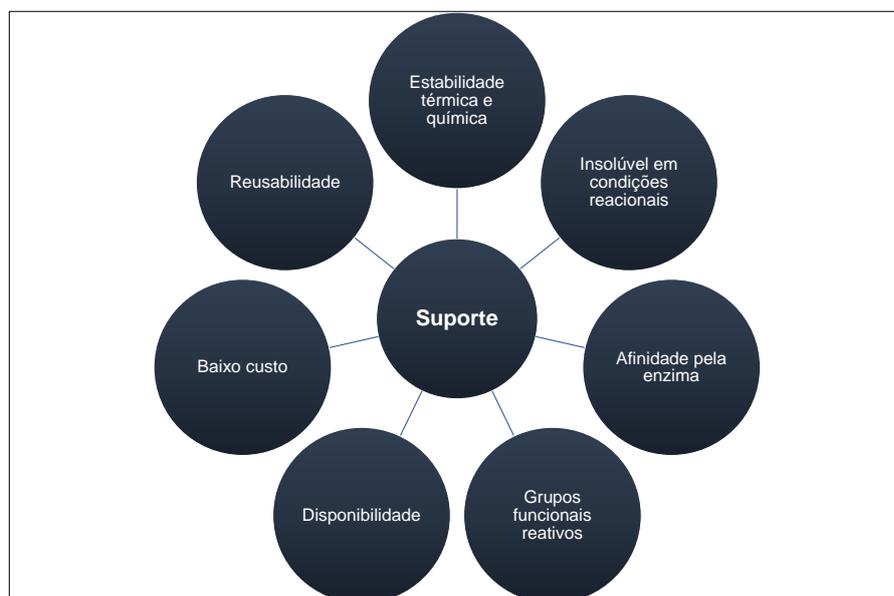
2.3.2 Suportes para imobilização enzimática

Tão importante quanto a escolha do método de imobilização, é a escolha do tipo de suporte a ser utilizado. Isso porque a interação enzima-suporte fornece propriedades químicas, bioquímicas, mecânicas e cinéticas específicas, por conta disso, características do suporte são de importância primordial no desempenho do sistema. Vale ressaltar que cada caso precisa ser analisado de maneira distinta, não existindo um suporte universal (PEREIRA, 2019).

Para isso, o material utilizado como suporte deve ser capaz de exercer mudanças conformacionais na estrutura do biocatalisador, sendo capaz de formar ligações estáveis entre a sua matriz e a enzima. Bem como os grupos funcionais de ambos os materiais precisam ter afinidade, para induzir a enzima expor os locais ativos e facilitar a interação com o substrato no meio reacional (REIS, 2020).

Portanto, o suporte ideal a ser utilizado deve reunir as seguintes características, representadas na Figura 4

FIGURA 4 – CARACTERÍSTICAS DESEJÁVEIS PARA OS SUPORTES.



FONTE: Adaptado de ZDARTA *et al.* (2018).

Além disso, os grupos químicos envolvidos na imobilização devem ser estáveis o suficiente para permitir que a enzima permaneça imobilizada no suporte por longos períodos de reação (PEREIRA, 2019).

Os suportes podem ser de composição orgânica ou inorgânica. Apesar dos suportes sintéticos (inorgânicos) apresentarem a possibilidade de combinações estruturais variadas e serem mais adequados para o uso industrial, os suportes naturais (orgânicos) apresentam vantagens como: baixo custo, fácil degradação, além de propor uma solução alternativa aos danos causados ao meio ambiente (MESQUITA, 2018).

Diante disso, materiais de origem orgânica como os resíduos agroindustriais, apresentam grande potencial devido as suas características físico-químicas e composições ricas em lignina, hemicelulose e celulose. Além de que esses compostos conseguem unir vantagens quanto à efetividade em imobilizar enzimas, quanto ao meio ambiente - sendo biodegradáveis - e quanto à questão financeira, (TANIGUCHI, 2017).

Essa preferência por suportes de origem orgânica ocorre porque na grande maioria das vezes, muitos materiais utilizados para imobilização são de origem sintética e não biodegradáveis, gerando consequências para o meio ambiente após sua utilização (COSTA *et al.*, 2015).

O presente trabalho teve como objetivo estudar a utilização de resíduos de milho como um suporte orgânico alternativo, devido à alta produtividade regional desse cultivar.

2.4 O MILHO

O milho, segundo a classificação botânica, pertence à ordem Gramineae, família *Poaceae*, *tribu Maydeae*, gênero *Zea* e espécie *Zea mays L.* Tratando-se de uma gramínea anual, alógama, monoica e com folhas paralelinérveas, com altura que varia de acordo com a variedade do cultivar (PEREIRA, 2019).

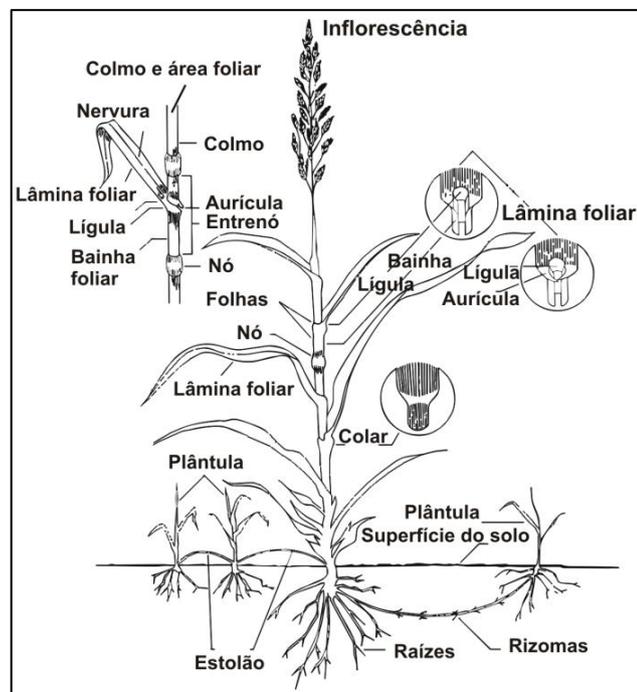
Dentre as espécies originárias das Américas, é certamente a de maior importância econômica e social em nível mundial (SILVA, 2014).

Por ser uma gramínea, o milho apresenta caule do tipo colmo cespitoso ereto, cilíndrico e geralmente não ramificado, apresenta nós e entrenós que se denominam

de meritalos. O aspecto do colmo é esponjoso, que, além de ter a função de suportar as folhas e partes florais, é também um órgão de reserva de sacarose (FONTANELI, SANTOS; FONTANELI, 2009). A estrutura do caule pode ser observada na Figura 5.

Já as folhas são estreitas, com o seu comprimento muito superior à largura, dispostas alternadamente entre os nós, constituídas de uma bainha invaginante, que a envolve no caule, pilosa característica de cor verde clara e limbo-verde escuro, estreito e de forma lanceolada, possuindo bordos serrilhados com uma nervura central vigorosa (BARROS; CALADO, 2014).

FIGURA 5 - PARTES DE UMA GRAMÍNEA GENÉRICA.



FONTE: FONTANELI, SANTOS e FONTANELI, 2009.

O consumo do milho em épocas festivas e culturais no preparo de derivados, como complemento e consumo humano, o torna um alimento importante para o comércio nacional, além de ser uma alternativa de grande valor econômico para médios e grandes agricultores, que inserem o produto no mercado (MOTA et al., 2020).

2.4.1 Mercado nacional de grãos

A história do cultivo de milho no Brasil é antiga, o cereal já era conhecido pelos índios brasileiros antes da chegada dos portugueses. Porém, a cultura começou a ganhar relevância e evoluir com o passar dos anos (MIRANDA *et al.*, 2021). Atualmente, a cadeia produtiva do milho é uma das mais importantes para o agronegócio brasileiro, representando uma parcela considerável na produção nacional de grãos (PEREIRA, 2019).

Segundo o Departamento de Economia Rural (DERAL), o Brasil é o terceiro maior produtor de milho, durante a safra 2019/20, considerada histórica, a produção brasileira superou 100 milhões de toneladas e a do Paraná ficou em torno de 15 milhões de toneladas. As estimativas apontam que a produção nacional para a safra 2021/2022 deve permanecer acima de 100 milhões de toneladas e o Estado do Paraná produzirá de 16 a 20 milhões de toneladas desse total.

Isso ocorre porque Paraná é um importante produtor de proteína animal, fator determinante para uma produção de milho relevante e necessária para suprir a demanda dessas cadeias. No ano de 2020, o Estado foi o 2º maior produtor de grãos, o 2º em faturamento bruto agropecuário e o 3º maior exportador do agronegócio (DERAL, 2022).

2.4.2 A problemática ambiental da superprodução agrícola

De maneira geral, a agricultura nacional apresenta diversos fatores determinantes para uma produtividade agrícola exponencial, que por sua vez produz uma grande quantidade de massa vegetal com potencial de biomassa que resultam em uma quantia significativa de resíduos pouco explorados e com reduzido aproveitamento diante da magnitude destas fontes (MONTEIRO; CRUZ; CASTRO, 2019).

Após a colheita do milho, os principais subprodutos deixados no campo são os caules, folhas e palhas, que na maioria dos casos não possui uma utilização bem definida, tornando-se um resíduo em potencial (ORELLANA *et al.*, 2020). Estima-se que para cada tonelada de milho processado são gerados, aproximadamente 700 kg somente de palha (SANTOS-ROCHA; ALMEIDA; CRUZ, 2017).

Os resíduos agrícolas são geralmente constituídos por lignina e celulose como principais componentes. Além destes, encontra-se ainda hemicelulose, extrativos, lipídeos, proteínas, açúcares simples, amido, água, hidrocarbonetos, cinzas e vários outros compostos contendo uma diversidade de grupos funcionais (SUD; MAHAJAN; KAUR, 2008).

Considerando os componentes bioativos presentes nesses materiais, os mesmos podem ser aproveitados e aplicados em diferentes áreas industriais, se tornando uma matéria prima de baixo custo e de alta disponibilidade, reduzindo os impactos ambientais causados (BARBOSA *et al.*, 2022). Dessa forma, o aproveitamento da biomassa residual dessas culturas (resíduos lignocelulósicos) para a síntese de bioprodutos, pode ser uma forma de agregar valor a um material em potencial, se tornando uma matéria-prima na produção de novos materiais de alto desempenho e uma aplicação comercial/industrial promissora.

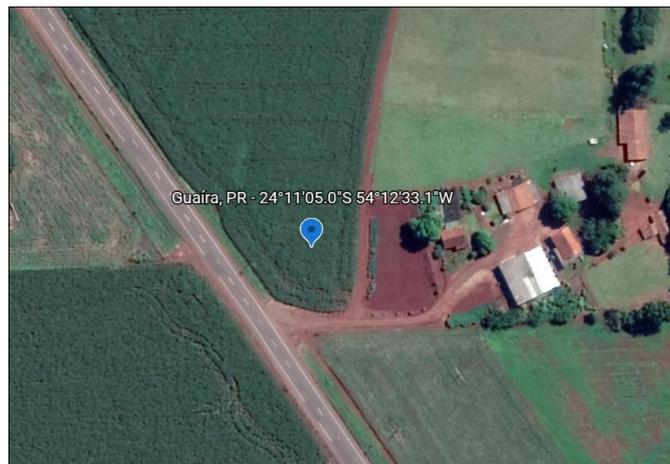
3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Resíduos da colheita de milho

Os resíduos de milho foram coletados na cidade de Guaíra – Paraná (24°11'05.0"S 54°12'33.1"W), no dia 20 de agosto de 2021, logo após a colheita do milho feita de forma mecanizada e armazenada em temperatura ambiente. A variedade do milho utilizada foi o milho KWS 9606.

FIGURA 6 - LOCAL DE COLETA DO RESÍDUO.



FONTE: Google Earth, 2019.

3.1.2 Enzimas

Foram utilizadas 9 lipases diferentes para o desenvolvimento do estudo, sendo elas: Lipase de *Pseudomonas fluorescens*, Lipase de *Candida rugosa*, Lipase de *Candida cylindracea*, Lipase de *Rhizopus niveus*, Lipase Pancreática Suína Tipo II, lipase PS de *Burkholderia cepacia*, Lipase de *Thermomyces lanuginosus* e Lipase de *Candida antarctica* Tipo B (CALB). Importante salientar que todas as enzimas utilizadas se encontravam na forma livre, não imobilizadas. Todas foram adquiridas por doação.

3.1.3 Reagentes

Para realização dos procedimentos, foram utilizados: Hidróxido de Potássio, Tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,4), etanol anidro, etanol absoluto 99,5%, hexano, sulfato de sódio, acetato de etila, hidróxido de sódio, iodo, água destilada, água ultrapura, diclorometano, acetato de etila, cicloexano (Vetec®) e fenolftaleína (Neon®).

3.1.4 Equipamentos

Foram utilizados também os seguintes equipamentos: Incubadora Shaker Refrigerada - LT 600/2 (Limatec ®), Espectrofotômetro de UV-Vis Helios Aquamate 2000E (Thermo™), Espectrômetro FT-NIR/MIR PerkinElmer (Frontier™), Centrífuga de Bancada – NI 1812 (Nova Instruments ®), Balança Analítica (Shimadzu™) - AY220, Agitador Magnético (Centouro ®), Placas de Sílica (Fluka analytical™).

3.2 METODOLOGIA

3.2.1 PREPARO DO MATERIAL

O preparo do material coletado para utilização como suporte seguiu os seguintes passos descritos na Figura 7.

FIGURA 7 – ESQUEMA DO PROCESSO DE PREPARO DO MATERIAL.



FONTE: O autor (2022).

A primeira etapa envolveu basicamente a separação das folhas secas (palhas) do caule bem como a retirada de partes indesejadas da planta, como sabugos e as raízes residuais da colheita, de acordo com a Figura 8. Após a separação, foi adotado a metodologia utilizada por JÁCOME (2017) para a lavagem e secagem do material.

A lavagem foi realizada em triplicata, utilizando uma relação de 1:10 m/V de material para água destilada, durante o processo, os resíduos foram agitados manualmente com um bastão de vidro, com o objetivo de aumentar a eficiência dessa etapa. Por fim, retirou-se o excesso de água e a amostra foi então seca em estufa a uma temperatura de 60°C durante 24 horas. Com o material seco, o mesmo foi armazenado em dessecadores para que não absorvessem a umidade do ambiente.

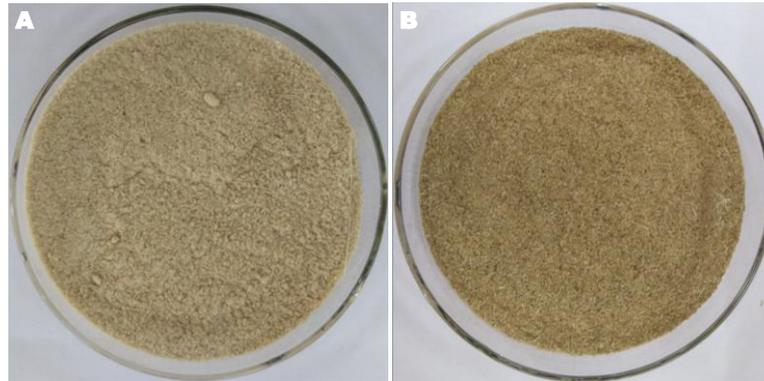
FIGURA 8 – MATERIAL APÓS AS ETAPAS DE SEPARAÇÃO..



A) Palha e caule pós colheita. B) Palha pós separação C) Caule pós separação
FONTE: O autor (2022).

Com o objetivo de tornar o material homogêneo e com uma maior superfície de contato, tanto para o tratamento térmico quanto para a imobilização enzimática, o resíduo foi moído com o auxílio de um moinho de facas, onde primeiramente acoplou-se uma peneira grossa, com uma abertura de 2 mm, ao equipamento e posteriormente, triturou-se em peneira média, com abertura de 1 mm, conforme a Figura 9.

FIGURA 9 – MATERIAL APÓS AS ETAPAS DE MOAGEM E PENERIAMENTO.



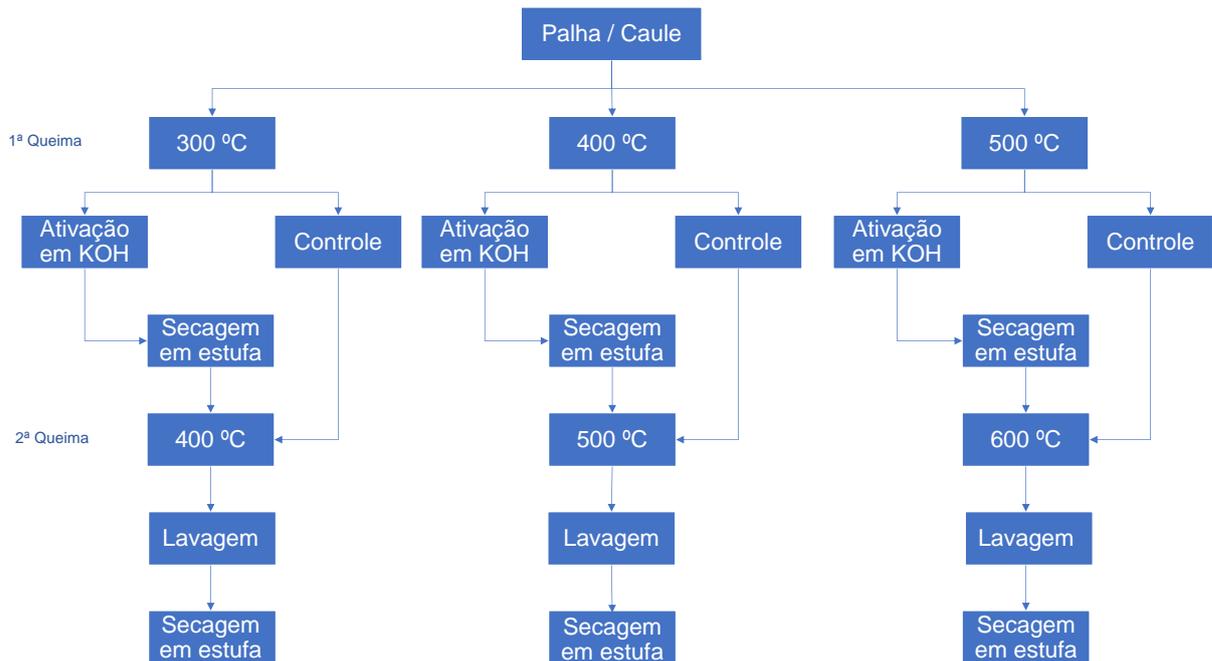
A) Caule triturado (1 mm). B) Palha triturada (1 mm).
FONTE: O autor (2022).

3.2.2 TRATAMENTO TÉRMICO E QUÍMICO

O tratamento térmico adotado seguiu uma metodologia adaptada de Sankar *et al.*, 2017, que resumidamente pode ser explicada em quatro etapas, sendo elas: a) Queima a uma temperatura branda; b) Ativação do material em hidróxido de potássio; c) Queima em uma temperatura mais alta que a primeira e d) Lavagem do material.

Com o objetivo de estudar a influência de diferentes temperaturas sobre a estrutura do material estudado, foram realizadas três combinações de queimas, sendo elas: 300 e 400 °C, 400 e 500 °C, 500 e 600 °C, sendo primeira e segunda queima respectivamente. Também foi estudada a influência da ativação ou não em hidróxido de potássio. O processo realizado pode ser melhor representado segundo o esquema da Figura 10.

FIGURA 10 – ESQUEMA GERAL DOS TRATAMENTOS TÉRMICOS.



FONTE: O autor (2022).

Os tratamentos térmicos foram realizados em mufla e submetidos a uma rampa de 5 °C/min até alcançar a temperatura desejada, após isso a amostra permaneceu em temperatura constante por 2 horas. Esse procedimento foi realizado para as duas amostras, tanto para a primeira queima quanto para a segunda, de acordo com as temperaturas apresentadas no fluxograma.

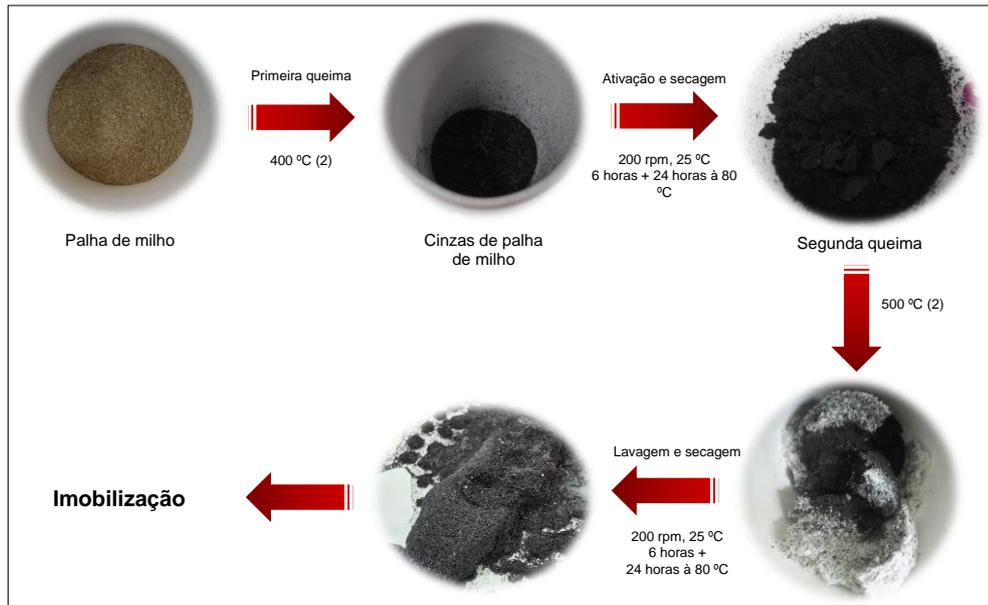
A ativação em hidróxido de potássio (KOH) foi realizada seguindo a proporção 4:1 m/m adotada pelo trabalho desenvolvido por Sankar *et al.*, 2017. Porém, ao invés de realizar a ativação através da maceração com almofariz e pistilo, foi adotada uma metodologia de ativação em meio líquido.

A ativação em meio líquido consistiu em adicionar a mistura do material tratado termicamente com o hidróxido de potássio em um meio contendo água ultrapura em uma proporção de 1:100 m/V. A solução então foi submetida a 6 horas de agitação a 200 rpm por 6 horas a 25 °C, posteriormente, filtrada com o auxílio de uma bomba a vácuo, utilizando funil de Buchner e filtro de papel, secas em estufa por 24 horas à 80 °C e submetida a segunda queima juntamente com a amostra que não foi ativada, com o objetivo de avaliar a influência da ativação sobre o material.

Após a segunda queima, as amostras foram lavadas com água ultrapura em uma proporção de 1:100 m/v, sob agitação constante a 200 rpm a 25 °C por 6

horas, novamente filtradas e secas em estufa por 24 horas à 80 °C. A figura apresentada a seguir busca apresentar um compilado de todas as etapas aplicadas ao primeiro conjunto de tratamento térmico (300 – 400 °C). Na Figura 11, são apresentadas os passos para a preparação do suporte.

FIGURA 11 – METODOLOGIA PARA A PREPARAÇÃO DO SUPORTE.



FONTE: O autor (2022).

3.2.3 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

A técnica utilizada para a imobilização enzimática foi baseada no estudo realizado por Shao *et al.*, (2015), que consistiu na imobilização de lipase pancreática suína em nanopartículas de Fe₃O₄ à base de óxido de grafeno.

Inicialmente, para assegurar que a enzima atua-se em um ambiente favorável, foi preparada uma solução tampão fosfato de sódio 0,05 M com pH 7,4 a partir da reação entre fosfato de sódio monobásico 0,05 M e fosfato de sódio dibásico 0,05 M. O preparo envolveu basicamente a mistura das duas soluções até obtenção do pH descrito. Com o tampão preparado, pode-se dar início ao processo de imobilização.

Para isso, foram separados tubos criogênicos de 5 mL suficientes para a imobilização de todas as enzimas a serem estudadas. Para a realização desse

procedimento, foi escolhido o suporte de palha tratada a 300 - 400 °C ativado com KOH (T1), devido a maior disponibilidade em termos de quantidade de massa.

Seguindo a metodologia de Shao *et al.*, (2015), em que foi utilizado a relação enzima-suporte para a imobilização de 1:1 m/m. Foram preparados os tubos criogênicos para as reações contendo as quantidades de enzima, suporte e tampão descritas na Tabela 2.

TABELA 2 – MASSAS DE ENZIMAS, SUPORTE E VOLUME DE TAMPÃO UTILIZADOS NA REAÇÃO DE IMOBILIZAÇÃO.

Enzima	Massa de enzima	Massa de suporte (Palha 300-400 °C ativada)	Volume de tampão fosfato
Lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	20 mg	20 mg	5 mL
Lipase de <i>Candida rugosa</i>	20 mg	20 mg	5 mL
Lipase de <i>Candida cylindracea</i>	20 mg	20 mg	5 mL
Lipase de <i>Rhizopus niveus</i>	20 mg	20 mg	5 mL
Lipase Pancreática Suína Tipo II	20 mg	20 mg	5 mL
Lipase PS de <i>Burkholderia cepacia</i>	20 mg	20 mg	5 mL
Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>	20 mg	20 mg	5 mL
Lipase de <i>Candida antarctica</i> Tipo B (CALB)	20 mg	20 mg	5 mL

Fonte: O autor (2022).

O preparo dos tubos reacionais consistiu primeiramente na diluição das enzimas na solução tampão e posteriormente a adição do suporte. Após isso os tubos foram mantidos sob agitação constante de 150 rpm, à 35 °C por 12 horas.

Além disso, foi escolhida a enzima Lipase de *Pseudomonas fluorescens* para ser imobilizada em todos os suportes sintetizados, tanto as palhas quanto os caules tratados ou não, por conta da enzima ter apresentado superiores as demais enzimas estudadas. Para isso, utilizou-se as mesmas proporções enzima/suporte apresentadas anteriormente.

3.2.3.1 Recuperação da enzima suportada

Após as 12 horas de reação (imobilização), a solução contendo a enzima imobilizada foi centrifugada por 5 minutos em rotação de cerca de 5000 rpm, com o

objetivo de separar a parte sólida (enzima + suporte) do sobrenadante líquido (solução tampão). O sobrenadante foi reservado para posteriormente quantificar a quantidade de enzima que se ligou ao suporte a partir da relação com a quantidade de enzima que restou no sobrenadante.

A parte sólida precipitada foi então suspensa com a adição de 5 mL de etanol absoluto e filtrada em um funil de filtração simples com papel filtro para a purificação do suporte-enzima, que posteriormente foi submetido a uma reação teste de esterificação.

3.2.3.2 Estimativa de proteínas pela quantificação do sobrenadante

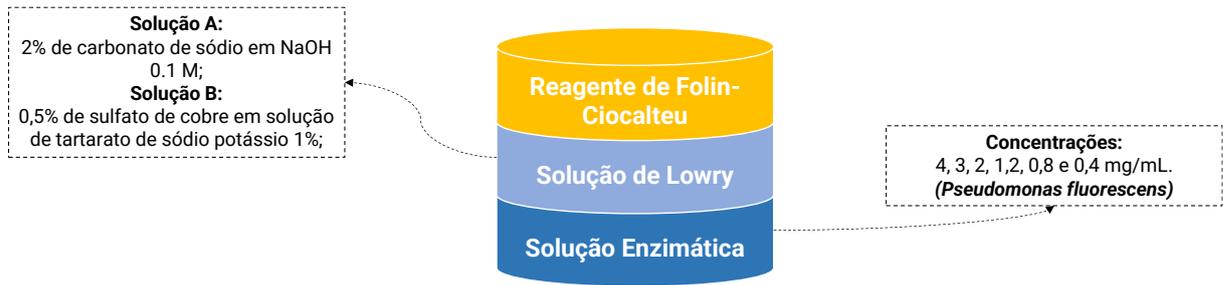
Para quantificar a quantidade de enzima que foi imobilizada no suporte, elaborou-se uma adaptação ao método de *Folin Lowry*, um dos métodos mais importantes de análise de proteínas para determinar a quantidade total de proteína presente em uma determinada amostra. O método consiste na construção de uma curva analítica de diferentes concentrações conhecidas para posteriormente quantificar uma amostra desconhecida de proteínas (LOWRY *et al.*, 1951).

Para isso, partiu-se de uma solução com concentração conhecida da lipase oriunda de *Pseudomonas fluorescens*, de 4 mg/mL e aplicou-se diluições obtendo então as concentrações de 3 mg/mL, 2 mg/mL, 1,2 mg/mL, 0,8 mg/mL e 0,4 mg/mL. Todas as soluções estão em mg de enzima para mL de tampão fosfato 0,05 M e pH 7,4.

O procedimento inicia com o preparo de duas soluções principais para a formulação da Solução *Lowry*, utilizada para os procedimentos da técnica, sendo elas:

- Solução A: 2% de carbonato de sódio em NaOH 0.1 M;
- Solução B: 0,5% de sulfato de cobre em solução de tartarato de sódio potássio 1%;
- Solução *Lowry*: 50 mL da Solução A + 1 mL da Solução B (Preparar imediatamente antes de usar).

O preparo dos meios reacionais pode ser simplificado pelo esquema presente na Figura 12.

FIGURA 12 – Esquema reacional do método de *Folin Lowry*.

Fonte: O autor (2022)

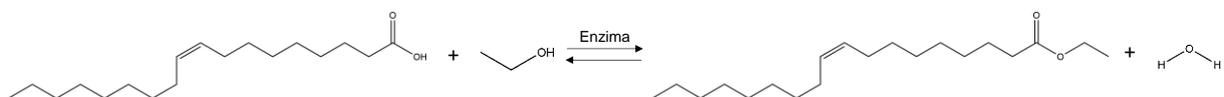
Adicionou-se então 0,2 mL de cada diluição em 6 tubos reacionais, respectivamente e 1 tubo reacional contendo apenas 0,2 mL de tampão fosfato para servir de branco reacional. Posteriormente, foi adicionado 4,5 mL da Solução de Lowry em cada tubo reacional e incubado por 10 minutos, após o período, adicionou-se 0,5 mL do Reagente de Folin-Ciocalteu e novamente incubado por 30 minutos. Terminado os períodos de incubação, a absorbância das amostras foi avaliada com o auxílio de um espectrofotômetro a 660 nm e anotadas para construção da curva analítica.

Com a curva analítica construída, repetiu-se o procedimento para todos os sobrenadantes obtidos na imobilização e a determinação de enzimas livres foi feita através da equação da reta, relacionando a concentração conhecida da enzima com a de interesse obtida na imobilização.

3.2.4 Síntese do oleato de etila via esterificação catalisada por lipases

Para testar a eficiência do resíduo de milho como suporte para imobilização enzimática, foi realizada uma reação de esterificação do ácido oleico para obtenção do oleato de etila. A reação de esterificação é uma reação realizada pelas lipases e baseia-se em uma reação de substituição nucleofílica do grupamento acila de um ácido carboxílico com um álcool, formando éster e água (MCMURRY, 2016). A reação de esterificação do ácido oleico pode ser observada na Figura 13.

FIGURA 13 – REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO DO ÁCIDO OLEICO.



FONTE: O autor (2022).

Para isso, adicionou-se um tubo criogênico de 5 mL 20 mg da enzima ligada ao suporte, 200 mg de ácido oleico, 500 μ L de etanol anidro e 20 mg de peneira molecular para remoção da água da reação.

Essa relação é útil porque cada reação de imobilização se comporta de uma maneira diferente, principalmente quando se trata de um estudo de afinidade de diferentes enzimas por um suporte. Dessa maneira, cabe salientar que cada reação de esterificação foi balanceada conforme a massa obtida do complexo suporte-enzima após o procedimento de imobilização seguindo a proporção global apresentada.

Após o preparo das reações, os tubos criogênicos foram incubados em um agitador orbital, por 24 horas, a 150 rpm a 32 °C. Após o período reacional, os tubos foram retirados e o produto filtrado utilizando um funil de filtração simples e papel filtro comum (qualitativo) em um béquer contendo 200mg de sulfato de sódio, o produto da filtração foi novamente filtrado em um béquer limpo para quantificação do composto.

Ambas as filtrações ocorreram com a adição de 10 mL de hexano, respectivamente. A adição do solvente foi realizada aos poucos, de 2 em 2 mL para que o produto da reação se solubilizasse e o complexo enzima-suporte possa ser purificado e reutilizado posteriormente.

3.2.5 Síntese do oleato de etila via esterificação catalisada pelos suportes a base de resíduo de milho (organocatálise)

Foram realizadas também, reações de esterificação do ácido oleico utilizando apenas os suportes obtidos com o objetivo de avaliar a capacidade de catálise dos mesmos. Para isso, seguindo a proporção global apresentada anteriormente meios reacionais contendo os suportes estão descritos na Tabela 3

TABELA 3 – COMPOSIÇÃO DO MEIO REACIONAL PARA OS TESTES DE CATALISE DOS SUPORTES

Tratamentos	Suportes	Quantidade (mg)	Ácido Oleico (mg)	Etanol anidro (µL)	Peneira molecular (mg)
T1	Palha 300 °C - 400 °C (Controle)	20	200	500	20
T2	Palha 300 °C - 400 °C (KOH)	20	200	500	20
T3	Palha 400 °C - 500 °C (Controle)	20	200	500	20
T4	Palha 400 °C - 500 °C (KOH)	20	200	500	20
T5	Palha 500 °C - 600 °C (Controle)	20	200	500	20
T6	Palha 500 °C - 600 °C (KOH)	20	200	500	20
T7	Caule 300 °C - 400 °C (Controle)	20	200	500	20
T8	Caule 300 °C - 400 °C (KOH)	20	200	500	20
T9	Caule 400 °C - 500 °C (Controle)	20	200	500	20
T10	Caule 400 °C - 500 °C (KOH)	20	200	500	20
T11	Caule 500 °C - 600 °C (Controle)	20	200	500	20
T12	Caule 500 °C - 600 °C (KOH)	20	200	500	20

Fonte: O autor (2022).

Após o preparo das reações, os tubos criogênicos foram submetidos aos mesmos procedimentos realizados anteriormente para as enzimas suportadas.

3.2.5.1 Análise qualitativa das reações

Para análise qualitativa do produto da reação, utilizou-se a cromatografia em camada delgada (TLC), uma técnica que utiliza uma camada fina como fase estacionária, geralmente formada por sílica depositada sobre uma placa de alumínio ou outro suporte inerte. O procedimento baseia-se na adição de pequenas gotas da solução das amostras a serem analisadas em um ponto próximo a extremidade inferior da placa.

A mesma é então condicionada em uma cuba de vidro contendo a fase móvel ou eluente, composta por uma mistura de solventes. Para o presente trabalho a solução utilizada foi uma mistura de ciclohexano:acetato de etila (95:5) V/V. Dessa

maneira, a base da placa fica submersa, o solvente então interage com a fase estacionária por capilaridade e a compatibilidade entre a polaridade do eluente com a amostra a ser analisada permite a revelação dos compostos de interesse.

Por se tratar de substâncias incolores, a revelação da placa precisa ser feita com a aplicação de um reativo que de cor às substâncias. Nesse caso, a revelação foi realizada em uma câmara de revelação contendo vapor de iodo.

3.2.5.2 Quantificação do rendimento das reações

O rendimento da reação foi avaliado pela capacidade da conversão de ácido oleico em oleato de etila. Para isso, após o término das reações de esterificação, foram realizadas as quantificações por meio do método de microtitulação.

O método de quantificação baseou-se na reação de neutralização do ácido oleico. Da maneira que a partir do volume de NaOH 0,1 M gastos durante a titulação, em uma relação de molaridade, é possível determinar a quantidade de ácido oleico presente na amostra.

Dessa forma, subtraindo a quantidade de ácido oleico obtido pela massa total da amostra titulada, é possível determinar também a quantidade de oleato de etila presente na mesma. A partir desses valores, é possível estimar o rendimento obtido pela reação.

Para o procedimento, adicionou-se 50 mg de cada produto obtido em frascos de vidro (do tipo penicilina) separadamente, em seguida, adicionou-se também 3 mL de etanol absoluto e 3 gotas de fenolftaleína. Colocou-se então o frasco em um agitador magnético, e foi acrescentada uma barra magnética para auxiliar na agitação, com a solução homogeneizada adicionou-se gota a gota de hidróxido de sódio 0,1 M na amostra até o indicador de alcalinidade indicar o ponto de viragem através da alteração na coloração da amostra. Então observou-se a quantidade de NaOH gasto que foi então relacionado com a reação de neutralização do ácido oleico.

3.2.6 Caracterização dos suportes

A caracterização dos suportes obtidos bem como a Lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada, foi realizada através de Espectroscopia no infravermelho por

Transformada de Fourier no modo de Reflexão Total Atenuada (ATR), um tipo de espectroscopia que baseia-se na reflexão de um feixe de radiação que atravessa de um meio denso (cristal de ATR) para um meio menos denso (amostra).

A partir dela é possível evidenciar a presença de grupos funcionais presentes na amostra, auxiliando na identificação do composto e investigar a composição química do mesmo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 TRATAMENTO TÉRMICO E QUÍMICO

Devido a limitação do tamanho dos cadinhos utilizados e pelo comportamento das amostras quando submetidas a altas temperaturas, para a realização da primeira queima, foi necessário dividir uma quantidade maior de massa de amostra *in natura* em cadinhos diferentes. Desse modo, ao chegar na segunda queima, as amostras foram misturadas em apenas um cadinho por tratamento, sendo eles: ativado com KOH e controle (sem adição de KOH). De acordo com a Tabela 4.

TABELA 4 – VARIAÇÕES DE MASSAS OBTIDAS PARA O CONJUNTO DE TRATAMENTO TÉRMICO 300 – 400 °C.

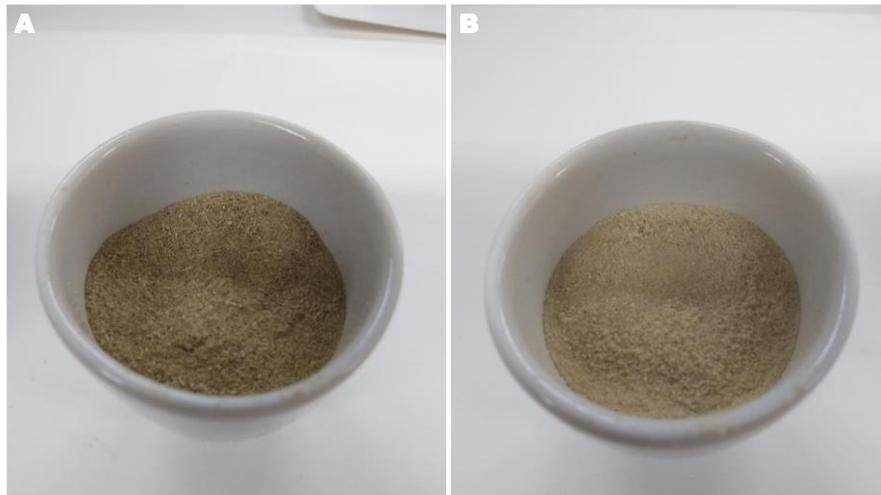
	Massa inicial (g)	Massa pós primeira queima (g)	Massa de KOH adicionada (g)	Massa pós segunda queima (g)	Produto final (g)
Palha	7,0041	1,7976	7,1904	2,5034	2,4989
	7,0025	1,9907	7,9628		
	7,0008	2,0871	0	2,2403	2,2309
	7,0014	1,7358	0		
Caule	4,0015	0,8443	3,3772	2,9018	4,3415
	4,0023	0,9441	3,7764		
	4,0016	0,8958	3,5832		
	4,0006	0,8925	3,57		
	4,0017	0,826	3,304	1,2958	3,5739
	4,0012	0,6675	0		
	4,0016	0,4578	0		
	4,0011	0,6493	0		
	4,0003	0,4344	0		
	4,0016	0,6633	0		

Fonte: O autor (2022).

É possível observar uma diferença de massa inicial entre as amostras de palha e as amostras de caule, isso ocorre por conta da diferença entre as características físico-químicas de cada amostra. O caule possui um aspecto muito mais esponjoso (baixa densidade) do que a palha, que por sua vez apresenta mais fibras, devido a característica natural dos dois compostos. Desse modo, as quantidades iniciais foram tomadas como padrão e serão repetidas durante os próximos tratamentos térmicos.

Visualmente, as amostras preencheram o cadinho de maneira muito semelhante, apesar da diferença entre as massas, conforme representado na Figura 14.

FIGURA 14 – CADINHOS PREPARADOS PARA A PRIMEIRA ETAPA DO TRATAMENTO TÉRMICO.



A) Amostra de palha *in natura* B) Amostra de caule *in natura*
FONTE: O autor (2022).

Quanto a perda de massa, a mesma foi significativamente expressiva. Quando comparado a massa inicial das amostras *in natura* com a massa produto final de ambos os materiais houve uma média percentual de 82,5 % de perda de massas. Isso está diretamente relacionado com a oxidação das amostras pelo tratamento térmico inadequado para o material, esse que por ser orgânico, quando submetido a altas temperaturas em atmosfera contendo oxigênio, favorece a formação cinzas que são removidas durante os processos de lavagem. Não houve diferença significativa de massas entre as amostras, tanto entre a palha e o caule, quanto para os tratamentos com hidróxido de potássio, mantendo assim um comportamento uniforme para o primeiro tratamento térmico.

Para o segundo conjunto de tratamento térmico, foram colocados uma menor quantidade de cadinhos por conta de uma relação entre a massa inicial e final do tratamento anterior que permitiu estimar uma quantidade de produto resultante para os próximos tratamentos.

Conforme apresentado na Tabela 5, as perdas de massa foram mais significativas, sendo que para a palha houve um percentual de perda de aproximadamente 93,3 %. Para os caules, foi ainda mais expressivo, ficando em 96,32 % aproximadamente.

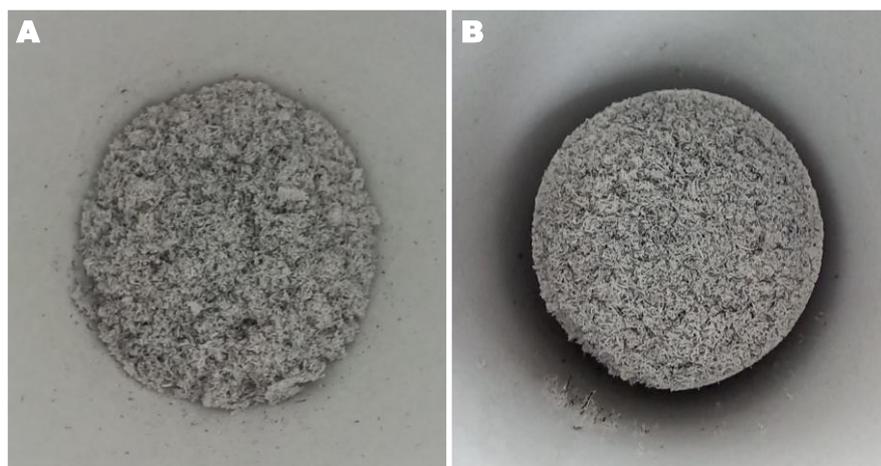
TABELA 5 – VARIAÇÕES DE MASSAS OBTIDAS PARA O CONJUNTO DE TRATAMENTO TÉRMICO 400 – 500 °C.

	Massa inicial (g)	Massa pós primeira queima (g)	Massa de KOH adicionada (g)	Massa pós segunda queima (g)	Produto final (g)
Palha	7,0007	1,1565	4,626	0,5016	0,4193
	7,0003	1,206	0	0,511	0,5131
Caule	4,0001	0,3665	8,092	0,4918	0,4623
	4,0004	0,4374			
	4,0011	0,7229			
	4,0006	0,4962			
	4,0000	0,5667	0	0,7379	0,7145
	4,0001	0,7124			
	4,0011	0,5328			
	4,0005	0,4889			

Fonte: O autor (2022).

Evidenciou-se que o maior percentual de perda pode estar diretamente relacionado ao aumento da temperatura do tratamento e conseqüentemente, o aumento da oxidação do material. Conforme apresentado na Figura 14, os materiais apresentaram uma considerável formação de cinzas, indesejável para o processo porque favorece a diminuição de massa durante as lavagens.

FIGURA 15 – AMOSTRAS APÓS A SEGUNDA QUEIMA DO CONJUNTO DE TRATAMENTOS (400 – 500 °C).



A) Amostra de palha após a segunda queima B) Amostra de caule após a segunda queima
 FONTE: O autor (2022).

Entende-se que devido ao aumento das temperaturas para o terceiro conjunto de tratamento térmico, foram utilizados uma maior quantidade de material com o

objetivo de obter-se uma quantidade considerável para as análises do produto. As quantidades utilizadas podem ser visualizadas na tabela a seguir.

TABELA 6 – VARIAÇÕES DE MASSAS OBTIDAS PARA O CONJUNTO DE TRATAMENTO TÉRMICO 500 – 600 °C.

	Massa inicial (g)	Massa pós primeira queima (g)	Massa de KOH adicionada (g)	Massa pós segunda queima (g)	Produto final (g)
Palha	7,0008	0,9659			
	7,0003	0,9992			
	7,0005	1,0378	16,1272	1,0326	0,9050
	7,0000	1,0289			
	7,0008	1,0212			
	7,0001	0,9603	0	1,3912	1,3379
	7,0005	1,1324			
	7,0008	1,1579			
Caule	4,0007	0,2593			
	4,0007	0,2872			
	4,0000	0,2642	4,316	0,1677	0,1417
	4,0008	0,2683			
	4,0002	0,2096			
	4,0001	0,4264			
	4,0003	0,3717			
	4,0003	0,3303	0	0,1821	0,2028
	4,0007	0,2593			
	4,0007	0,2872			

Fonte: O autor (2022).

Identificou-se que a oxidação dos materiais submetidos ao conjunto de tratamento 500 – 600 °C foi a mais expressiva, ocasionada pelo aumento de temperatura do tratamento, elevando o percentual de perda a aproximadamente 98,7 %. A amostra submetida a esse tratamento foi quase que em totalidade, convertida em cinzas.

A perda de material decorrente ao aumento da temperatura nos tratamentos térmicos pode ser explicada pelas zonas de temperaturas propostas relacionadas com a decomposição do material, que podem ser visualizadas na Tabela 7.

TABELA 7 – DEVOLATIZAÇÃO DA BIOMASSA EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA

Zonas	Faixa de temperatura	Característica da decomposição
Zona I	< 100 °C	Perda da umidade do material
Zona II	100 °C a 250 °C	Decomposição dos extrativos
Zona III	250 °C a 350°C	Predomina a decomposição da hemicelulose
Zona IV	350 °C a 500 °C	Decomposição da celulose e parte da lignina
Zona V	> 500°C	Decomposição do restante da lignina

Fonte: Santos (2011).

4.2 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

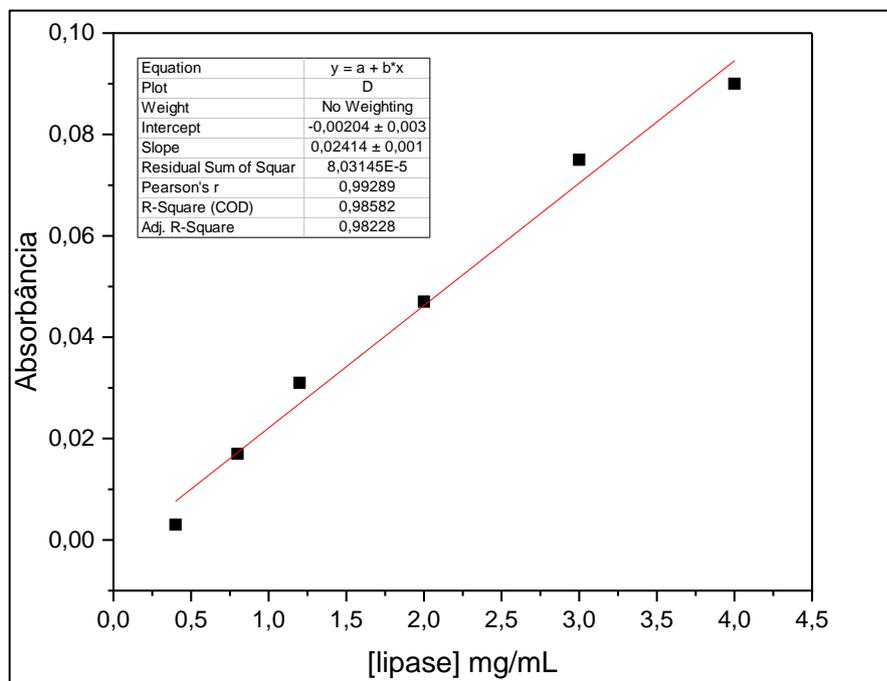
Quantificou-se as proteínas que aderiram ao suporte a partir da construção de uma curva analítica que relaciona as absorbâncias de determinadas concentrações proteicas. Para o presente trabalho, as absorbâncias medidas para a solução de Lipase de *P. fluorescens* estão descritas na tabela abaixo, bem como a curva analítica representada pela Tabela 8.

TABELA 8 – ABSORBÂNCIAS DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE *P. FLUORESCENS* EM TAMPÃO FOSFATO.

Concentração (mg/mL)	Absorbância
4	0,09
3	0,075
2	0,047
1,2	0,031
0,8	0,017
0,4	0,003

Fonte: O autor (2022).

GRAFICO 1 - CURVA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO ENZIMÁTICA.



FONTE: O autor (2022).

A partir dos resultados obtidos, delineou-se a afinidade da lipase oriunda de *P. fluorescens* pelos suportes sintetizados. A quantificação dos sobrenadantes pode

ser melhor representada na figura abaixo, que traz a concentração de enzimas em mg/mL presente no sobrenadante das reações de imobilização.

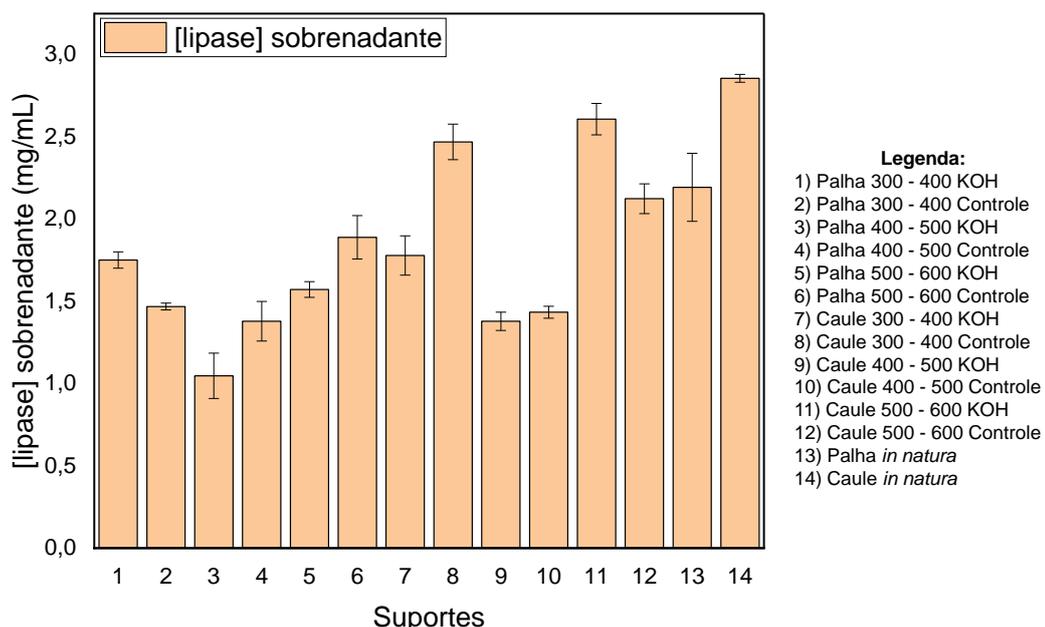
Evidenciou-se, a partir do Gráfico 2, que a enzima possui uma grande afinidade pela maioria dos suportes sintetizados. A concentração enzimática ficou abaixo de 2 mg/mL em 9 dos 14 suportes testados, com destaque para o suporte de Palha (400 – 500 °C) ativado com hidróxido de potássio, pela menor concentração de enzimas livres (1,05 mg/mL) no sobrenadante e conseqüentemente uma maior quantidade de enzima que se ligou ao suporte.

O teor de proteína encontrado foi consideravelmente menor do que o encontrado por Taniguchi (2017) que foi de 1,58 mg/mL, que avaliou a imobilização da invertase oriunda da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, imobilizada em pó de sabugo de milho ativado com glutaraldeído.

Além disso, COSTA *et al.* (2014), obteve um rendimento de imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* em pó de sabugo de milho de 62%. Um rendimento inferior ao obtido no presente estudo, de 73,75%.

O teor de proteína encontrado, neste estudo, foi ligeiramente maior que o encontrado por Caravante (45), que foi de 1,5 mg/mL. A autora supracitada utilizou o mesmo método de extração das enzimas, isto é, por meio de maceração manual intensa com adição de éter etílico.

GRAFICO 2 - CARACTERIZAÇÃO DOS SOBRENADANTES DA IMOBILIZAÇÃO DE *P. FLUORESCENS* EM TODOS OS SUPORTES.



FONTE: O autor (2022).

Em contrapartida, a imobilização utilizando Caule *in natura* obteve o pior resultado dentre os suportes, com uma concentração de 2,86 mg/mL, seguido do suporte de Caule (500 – 600 °C) ativado com hidróxido de potássio e Caule (300 – 400 °C) controle.

A tentativa de quantificar a afinidade das demais enzimas foi realizada, porém, ao comparar os valores de absorvâncias obtidos, os valores extrapolavam o máximo da curva analítica, a qual foi preparada a partir da concentração inicial utilizada para a imobilização.

Fato que pode estar atrelado as características da lipase de *P. fluorescens*, a qual pode ter particularidades quanto a absorvâncias no espectro. Como também pode estar relacionado com as lipases de modo geral. Sendo assim, apenas as reações envolvendo a imobilização da lipase de *P. fluorescens* foi quantificada.

4.3 RENDIMENTO DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO

Utilizou-se como método de quantificação das reações a titulação ácido-base, dessa maneira a partir do volume de NaOH gasto para titular é equivalente a quantidade de ácido oleico presente na amostra e a partir disso, é possível determinar o rendimento da reação.

Primeiramente, com o objetivo de determinar o volume de NaOH 0,1 M gastos para a titulação de interesse com maior precisão, realizou-se a titulação do etanol absoluto em triplicata. A média dos valores obtidos foi subtraída das demais titulações dos produtos. Os volumes gastos para a titulação do mesmo estão dispostos na Tabela 9.

TABELA 9 - TITULAÇÃO DO ETANOL ABSOLUTO.

Suporte	Volume de NaOH (mL)
Etanol absoluto – Solução 1	0,02
Etanol absoluto – Solução 2	0,03
Etanol absoluto – Solução 3	0,02
Média	0,02

Fonte: O autor (2022).

Posteriormente, foi testado a capacidade catalítica dos suportes sintetizados, sem adição de enzimas, e os resultados obtidos para os rendimentos estão descritos na tabela que segue.

TABELA 10 – RENDIMENTO DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO DO ÁCIDO OLEICO CATALISADA PELOS SUPORTES.

Suporte	Rendimento (%)
Palha 300 – 400 °C KOH	27,61
Palha 300 – 400 °C Controle	29,29
Palha 400 – 500 °C KOH	23,15
Palha 400 – 500 °C Controle	20,85
Palha 500 – 600 °C KOH	26,06
Palha 500 – 600 °C Controle	21,54
Caule 300 – 400 °C KOH	28,25
Caule 300 – 400 °C Controle	26,66
Caule 400 – 500 °C KOH	33,56
Caule 400 – 500 °C Controle	13,73
Caule 500 – 600 °C KOH	42,81
Caule 500 – 600 °C Controle	41,00

Fonte: O autor (2022).

De acordo com os rendimentos obtidos, observa-se que os suportes de Caule 500 – 600 °C tanto o ativado quanto o controle, resultaram em melhores rendimentos reacionais, sendo 42,8 e 41 % respectivamente. Seguidos do suporte também de caule, porém, com o conjunto de tratamento térmico 400 – 500 °C ativado, com um rendimento de 33,56 %. Os demais suportes apresentaram rendimentos parecidos entre eles, sem mais destaques.

A titulação das reações catalisadas pelas enzimas seguiu o mesmo padrão realizado anteriormente. Todas as enzimas citadas, foram imobilizadas no suporte de Palha (300 – 400 °C) ativado com hidróxido de potássio. A escolha pelo suporte foi feita por conta de ser o suporte com maior quantidade de massa resultante dos tratamentos térmicos.

Os rendimentos das reações catalisadas estão representados na Tabela 11.

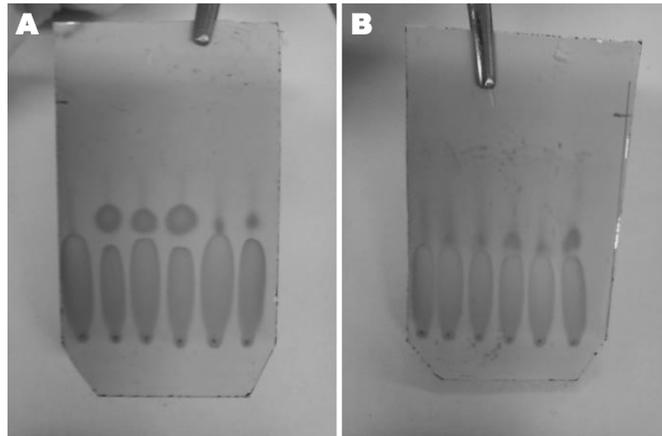
TABELA 11 – RENDIMENTO DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO DO ÁCIDO OLEICO CATALISADA POR LIPASES.

Suporte	Rendimento (%)
Lipase de <i>P. fluorescens</i>	41,15
Lipase de <i>C. antarctica</i> Tipo B (CALB)	18,82
Lipase de <i>C. cylindracea</i>	18,12
Lipase PS de <i>B. cepacia</i>	16,97
Lipase Pancreática Suína Tipo II	13,14
Lipase de <i>R. niveus</i>	12,58
Lipase de <i>T. lanuginosus</i>	9,99
Lipase de <i>C. rugosa</i>	9,60

Fonte: O autor (2022).

A partir dos resultados obtidos, evidenciou-se a maior afinidade da Lipase de *P. fluorescens* pelo suporte diante as demais enzimas. A diferença entre as catálises realizadas é apresentada também na caracterização qualitativa cromatográfica, representada pela Figura 16.

FIGURA 16 – CROMATOGRAFIA EM CAMADA FINA DA CATALISE DO ÁCIDO OLEICO.



A) Ácido oleico; *P. fluorescens*; *P. fluorescens*; *P. fluorescens*; *C. cylindracea*; *R. niveus* B) Ácido oleico; *C. rugosa*; Lipase Pancreática Suína; *B. cepacia*; *T. lanuginosus*; *C. antarctica tipo B*
 FONTE: O autor (2022)

Na Figura 16, para ambas as cromatografias apresentadas, pode-se observar um primeiro sinal (spot) do reagente utilizado, o ácido oleico, seguido dos produtos reacionais para as catálises enzimáticas. Sendo que, todos os pontos apresentam o sinal do ácido oleico e nos spots reacionais, há um segundo sinal acima do primeiro, que representa o produto da reação, o oleato de etila.

Conforme apresentado, a Lipase de *P. fluorescens* apresentou-se muito mais marcante que as demais, indicando uma maior formação de produto a qual foi fundamentada pela quantificação do rendimento. As demais enzimas classificaram-se com resultados de rendimento muito baixos, porém algumas considerações devem ser feitas.

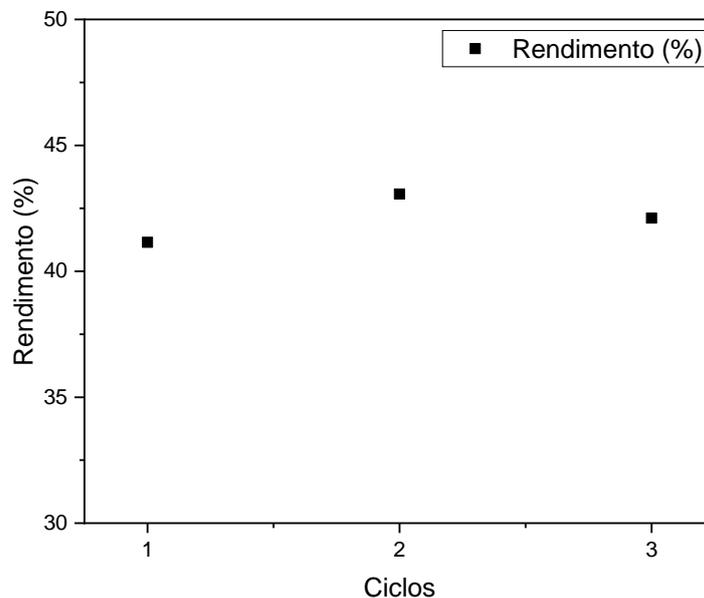
A primeira consideração a ser realizada é quanto ao suporte utilizado, dentro do período da pesquisa apenas um suporte foi testado com todas as enzimas, impossibilitando o estudo da afinidade pelos demais suportes sintetizados. Além disso, a CALB foi utilizada de forma líquida e pesada na mesma quantidade que as enzimas sólidas, por conta disso, existe a possibilidade de a relação massa-volume não ser 1:1, dificultando um resultado preciso sobre a mesma.

Os fatores gerais como temperatura, agitação e pH podem também influenciar o comportamento enzimático e prejudicar o rendimento reacional das enzimas.

A partir dos resultados positivos obtidos para a lipase oriunda de *P. fluorescens*, demais estudos foram realizados, dentre eles o reuso da enzima imobilizada, para isso, foram realizadas três reações em sequência, onde o complexo enzima-suporte era recuperado de uma reação e colocado novamente para catalisar uma nova reação.

Conforme evidenciado no gráfico seguinte, o rendimento da enzima se manteve durante os três ciclos realizados, surgindo então como possibilidade de estudar um maior número de reusos da enzima imobilizada. Esse resultado, é importante pois caracteriza a principal vantagem de utilizar uma enzima suportada que é a capacidade do reuso. Diante disso, pode-se afirmar que a enzima está imobilizada no suporte, que por sua vez é efetivo para a função proposta.

GRAFICO 3 – RENDIMENTO DAS REUTILIZAÇÕES DE *P. FLUORESCENS* EM SUPORTE PALHA 300 – 400 °C KOH.



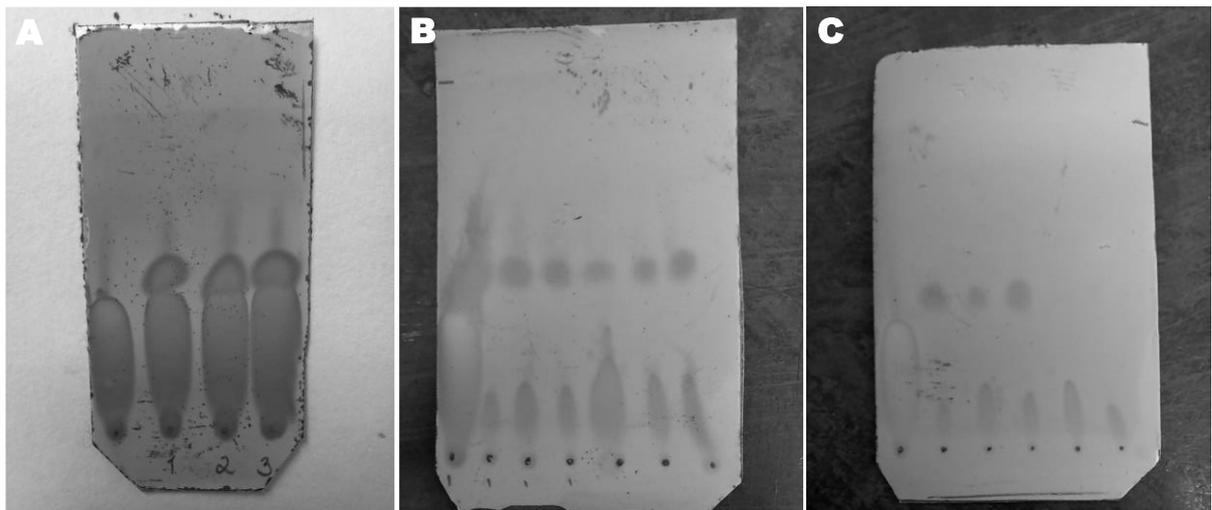
FONTE: O autor (2022).

De maneira qualitativa, foi realizada uma análise cromatográfica em camada fina das três reações de reuso e evidenciou-se também uma similaridade entre os três resultados, contribuindo para os resultados obtidos para a quantificação do rendimento reacional. A cromatografia esta representada pela Figura 16.

Além do reuso, foi testado a efetividade de todos os suportes na imobilização enzimática da Lipase de *P. fluorescens*. O rendimento das reações está representado na Tabela 11. A partir dos resultados obtidos para a quantificação do rendimento reacional foi possível relacionar com os resultados obtidos para a quantificação do sobrenadante. Sendo que os suportes que a enzima apresentou maior afinidade são os que apresentaram maiores rendimentos de esterificação, estando coerentes entre si. É possível verificar também na Figura 17-C, que não houve catálise para os suportes de caule submetidos ao tratamento térmico de 500 – 600 °C, pela não formação do sinal para oleato de etila, conforme visualizado nas outras reações.

Por serem compostos do mesmo material e tratados de maneira muito semelhante, uma inibição da enzima pelo substrato pode justificar a não catálise do ácido oleico.

FIGURA 17 – RENDIMENTO DAS REAÇÕES CATALISADAS POR *P. FLUORESCENS*



A) Reutilizações de Lipase de *P. fluorescens*. em suporte Palha 300 – 400 °C KOH;
B e C) Reações de esterificação em todos os suportes catalisadas por Lipase de *P. fluorescens*.
FONTE: O autor (2022).

TABELA 12– RENDIMENTO DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO DO ÁCIDO OLEICO CATALISADA POR *P. FLUORESCENS* EM TODOS OS SUPORTES.

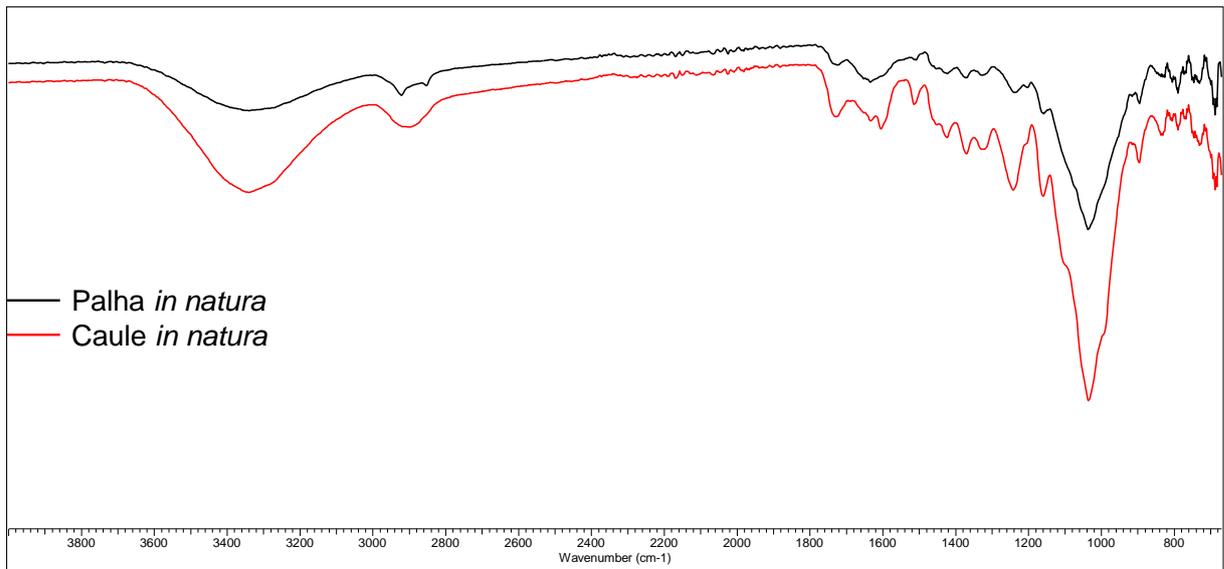
Suporte	Rendimento (%)
Palha 300 – 400 °C KOH	41,15
Palha 300 – 400 °C Controle	80,51
Palha 400 – 500 °C KOH	71,23
Palha 400 – 500 °C Controle	68,56
Palha 500 – 600 °C KOH	19,17
Palha 500 – 600 °C Controle	46,51
Caule 300 – 400 °C KOH	48,97
Caule 300 – 400 °C Controle	73,91
Caule 400 – 500 °C KOH	32,04
Caule 400 – 500 °C Controle	70,48
Caule 500 – 600 °C KOH	-
Caule 500 – 600 °C Controle	-

Fonte: O autor (2022).

4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS SUPORTES

A Figura 17 mostra espectros no Infravermelho com transformada de Fourier no modo de reflexão total atenuada (ATR), referentes a palha e o caule, ambos *in natura*, utilizados para os preparos dos demais suportes.

FIGURA 18 - ESPECTRO DE ATR PARA A PALHA E CAULE IN NATURA.



FONTE: O autor (2022).

Na Tabela 12, estão apresentadas as principais bandas presentes no espectro referente aos materiais analisados, com suas respectivas atribuições.

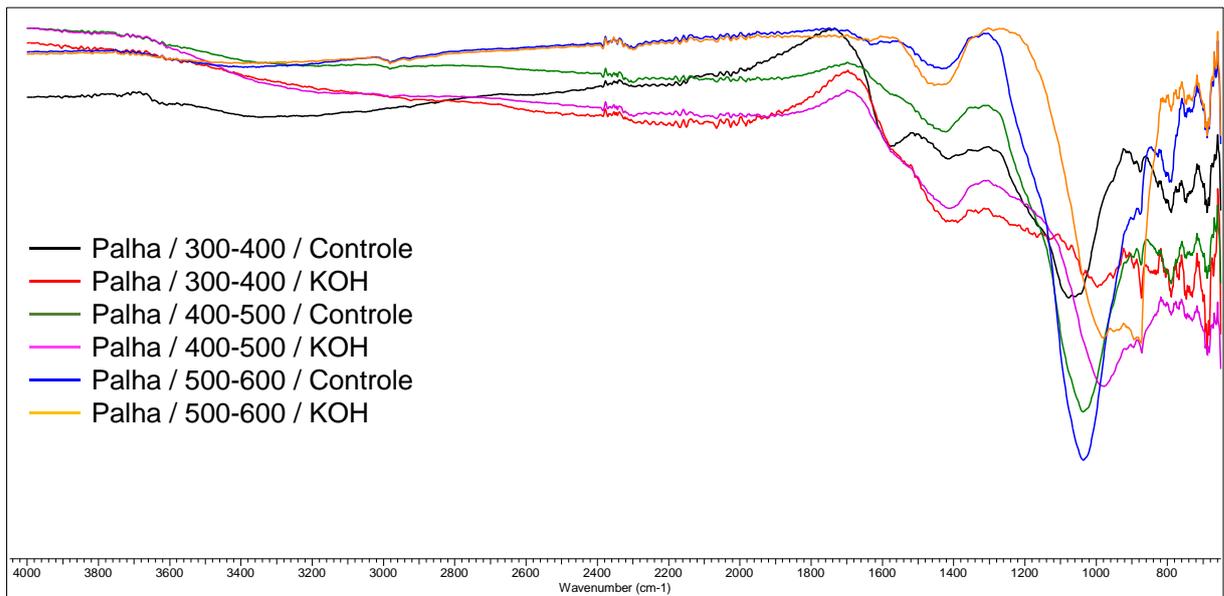
TABELA 13 - PRINCIPAIS BANDAS APRESENTADAS NO ESPECTRO PARA PALHA E CAULA IN NATURA.

Amostra	Bandas (cm ⁻¹)	Atribuições
Palha e Caule	3345	Estiramento O-H, indicando presença de hidroxila na amostra
	2850-2920	Bandas de estiramento -CH ₂ - (compostos alifáticos)
	1731	Banda de baixa intensidade de C=O (grupamentos carbonilas)
	1634	Estiramento do grupo C=C
	1240	Deformação axial assimétrica -C-O-C
	1036	Deformação axial simétrica -C-O-C-
Caule	895	Deformação angular fora do plano de anéis aromático substituídos
	1514	Presença -C=C- de anel aromático
	1327	Presença de ésteres C-OH

Fonte: O autor (2022)

Foram analisados também os espectros para os tratamentos realizados tanto para a palha, quanto para o caule que serão apresentados separadamente nas Figuras 19 e 20.

FIGURA 19 – ESPECTRO DE ATR PARA OS TRATAMENTOS TÉRMICOS DA PALHA.



FONTE: O autor (2022).

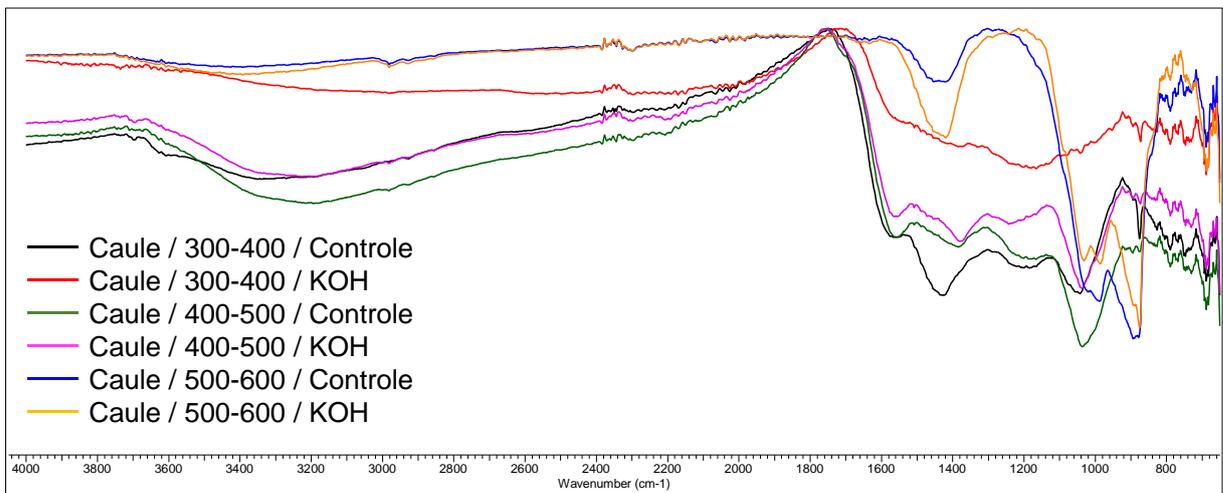
TABELA 14- PRINCIPAIS BANDAS APRESENTADAS NO ESPECTRO PARA PARA OS TRATAMENTOS TÉRMICOS DA PALHA.

Amostra	Bandas (cm ⁻¹)	Atribuições
Ambos	1576	Indica a presença de alcenos -C=C-
	1400	Estiramento de C-N
Ativação com KOH	980	Característica de dobramento de alceno (C=C).
Não ativados	1040	Deformação axial assimétrica de -C-O-C- (grupo epóxi)

Fonte: O autor (2022)

É possível verificar que todos os suportes não ativados controles apresentam banda em torno de 1040 cm⁻¹, que indica a deformação axial assimétrica de grupamentos epóxi, em contrapartida, os suportes ativados essa banda desaparece, fator que pode estar ligado devido a abertura do anel epóxi pela ação da base utilizada.

FIGURA 20 – ESPECTRO DE ATR PARA OS TRATAMENTOS TÉRMICOS DO CAULE.



FONTE: O autor (2022).

TABELA 15 - PRINCIPAIS BANDAS APRESENTADAS NO ESPECTRO PARA OS TRATAMENTOS TÉRMICOS DA PALHA.

Amostra	Bandas (cm ⁻¹)	Atribuições
Ambos	3345	Estiramento O-H, indicando presença de hidroxila na amostra
	1576	Indica a presença de alcenos -C=C-
	1400	Estiramento de C-N
	1036	Deformação axial simétrica -C-O-C-
	895	Deformação angular fora do plano de anéis aromático substituídos

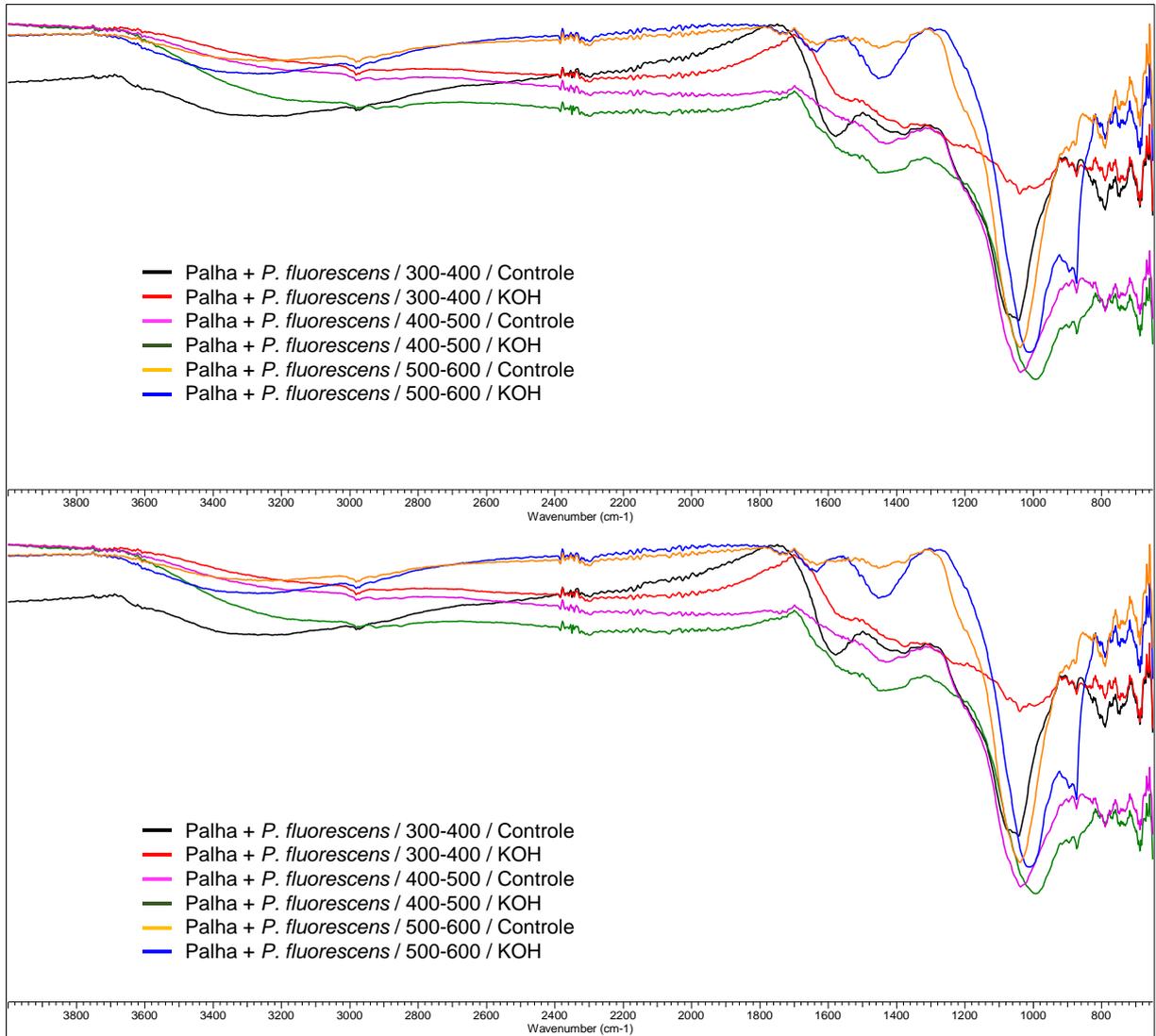
Fonte: O autor (2022)

Com o objetivo de analisar a influência na estrutura tanto da enzima quanto do suporte após o processo de imobilização, bem como do comportamento do complexo após a reação, foram realizadas análises de infravermelho da enzima suportada logo após a imobilização e após a recuperação da reação de esterificação. Não foram evidenciadas diferenças estruturais consideráveis, a nível do espectro infravermelho.

Dessa maneira, evidenciou-se que as amostras dos suportes com a enzima imobilizada se comportaram de maneira muito semelhante aos suportes sozinhos, sem alterações nos compostos químicos existentes, conforme apresentado nas Figuras 20 e 21.

Observou-se, de maneira geral, que o hidróxido de potássio, utilizado para ativação do suporte, está favorecendo a formação de ligações duplas, possivelmente devido a reações de eliminação. Tal fato foi percebido por conta dos espectros dos suportes não imobilizados apresentarem bandas de éteres (epóxidos -C-O-C-).

FIGURA 21 – ESPECTRO DE ATR PARA AS IMOBILIZAÇÕES DA LIPASE DE *P. FLUORESCENS* EM PALHA.

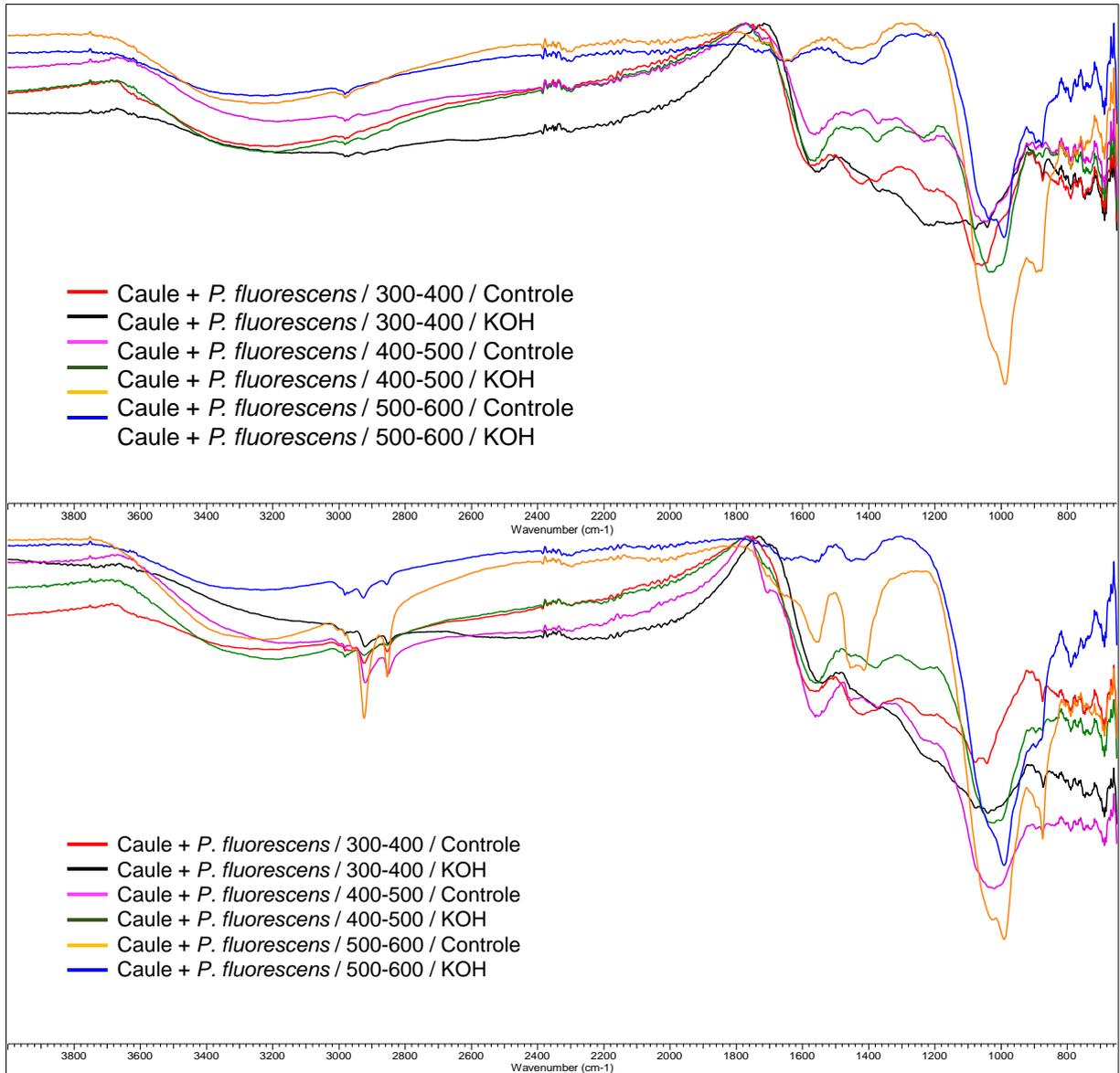


Superior: Enzima + Suporte antes da reação. Inferior: Enzima + Suporte pós reação
 FONTE: O autor (2022)

Conforme pode ser observado nas figuras apresentadas acima, o complexo enzima-suporte não sofreu alterações significativas a nível do espectro infravermelho ocorridas durante a reação de catálise. Os resultados para o espectro realizado antes da reação (superior) e após a reação (inferior) foram idênticos aos resultados para o suporte não imobilizado, não apresentando bandas diferentes entre os mesmos.

Portanto, pode-se concluir que a nível do espectro infravermelho, a enzima não apresentou alterações no suporte utilizado, bem como a reação de esterificação não influenciou na estrutura do complexo enzima-sustrato. Resultado muito importante quando levado em consideração o potencial de reutilização enzimática.

FIGURA 22 – ESPECTRO DE ATR PARA AS IMOBILIZAÇÕES DA LIPASE DE *P. FLUORESCENS* EM CAULE.



Assim como observado para os suportes a base de palha, a estrutura das enzimas suportadas no suporte a base de caule também não sofreu alterações durante a catálise do ácido oleico.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Compreende-se que o desenvolvimento dessa pesquisa trouxe informações relevantes sobre as possibilidades de imobilização de enzimas. Considerando que o uso das mesmas em grande escala depende da eficiência de sua imobilização, a utilização de suportes adequados é essencial para um processo bem desenvolvido.

A partir dos resultados obtidos, pode-se considerar que os resíduos gerados pelos cultivares de milho (*Zea mays L*) apresentam um grande potencial como suporte enzimático, em especial para a Lipase de *Pseudomonas fluorescens*, a qual apresentou resultados interessantes de afinidade pelo suporte, que conseqüentemente, resultou em bons rendimentos catalíticos.

Dentre as 14 possibilidades de suportes sintetizados, 9 apresentaram-se como potenciais imobilizadores enzimáticos, aprisionando mais da metade das enzimas. Levando em consideração que foi realizado apenas uma condição de imobilização, conclui-se que pode haver muitos resultados positivos a serem estudados, começando pelo aumento da relação m/m de suporte-enzima.

Além disso, verificou-se que o maior rendimento obtido para a reação de catálise foi obtido com o suporte de palha (300 – 400 °C) sem ativação. Suporte que, dentre os suportes sintetizados, é o mais simples de ser preparado pois envolve um menor tempo de queima na mufla e não há tratamento químico, mantendo sua estrutura muito próxima a estrutura natural da planta. Percebe-se também que o principal objetivo de utilizar a técnica de imobilização, que é a capacidade de recuperação e reuso da enzima, foi alcançado.

Conclui-se então que o objetivo do trabalho foi alcançado. A partir da metodologia utilizada foi possível propor uma solução para duas problemáticas: uma problemática ambiental, sobre a geração de resíduos e a outra sobre a inviabilidade de utilizar enzimas livres a nível industrial. Desse modo, foi possível agregar valor ao resíduo de milho, tornando-o um material em potencial para uso industrial e propor uma alternativa para utilização de lipases.

REFERÊNCIAS

- BALDO, C. et al. **Utilization of agroindustrial byproducts for the production of lipase by a new strain of Pseudomonas sp.** Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, v. 41, n. 2, p. 165, 2020. Disponível em: <<https://proceedings.science/cpm/papers/utilization-of-agroindustrial-byproducts-for-the-production-of-lipase-by-a-new-strain-of-pseudomonas-sp?lang=en>>.
- BARBOSA, M. DOS S. et al. **Interações entre o meio ambiente, desenvolvimento sustentável e economia circular.** 1. ed. [s.l.] AYA Editora, 2022. Disponível em: <<https://ayaeditora.com.br/Livro/17413/>>
- BARROS, J. F.; CALADO, J. G. **A Cultura do Milho.** Universidade de Évora. 2014. Disponível em: <<https://dspace.uevora.pt/rdpc/bitstream/10174/10804/1/Sebentamilho.pdf>>.
- BRITO, M.J.P. **Síntese de carvões ativados a partir de resíduos da agroindústria e sua aplicação na imobilização de lipase.** Itapetinga – BA: UESB, 2020. p.138 (Tese Doutorado em Engenharia de Alimentos – Engenharia de Alimentos).
- CHANDRA, P. et al. Microbial lipases and their industrial applications: a **comprehensive review.** Microbial Cell Factories, v. 19, n. 1, p. 169, 2020. Disponível em: <http://www2.uesb.br/ppg/ppgecal/wp-content/uploads/2017/04/Disserta%C3%A7%C3%A3o_Mylena-Junqueira_Final-P%C3%B3s-defesa.pdf>.
- COSTA, D. M. et al. **Aplicação de sabugo de milho como suporte para imobilização de lipase.** Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. **Anais.** Em: XX CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA. Florianópolis, Brasil: Editora Edgard Blücher, 2015. Disponível em: <<http://www.proceedings.blucher.com.br/article-details/16929>>.
- DENTI, A. F. **Tecnologia enzimática: classificação, imobilização, suportes e aplicações.** Revista Perspectiva, v. 45, n. 171, p. 97–110, 13 out. 2021. Disponível em: <<http://ojs.uricer.edu.br/ojs/index.php/perspectiva/article/view/168>>.
- DERAL - Departamento de Economia Rural. **Conjuntura Agropecuária.** Disponível em: <<http://www.agricultura.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=74>>.
- FILHO, D. G.; SILVA, A. G.; GUIDINI, C. Z. Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 103, n. 18, p. 7399–7423, 2019. Disponível em <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31375880/>>.
- FONTANELI, REN. S.; SANTOS, H. P. dos; FONTANELI, ROB. S. (Ed.). **Forrageiras para integração lavoura-pecuária-floresta na região sul-brasileira.** Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2009. Cap. 2, p. 33-40. Disponível em: <<http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/li/li01-forrageiras/cap2.pdf>>.

FURLANI, I. et al. Imobilização enzimática: conceito e efeitos na proteólise. **Química Nova**, 2020. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/qn/a/vSrVLzC3bZnQpsc8Fw9s8tD/?lang=pt>>.

JACOME, S. A. M. **Obtención de grafeno a partir de cascarilla de arroz ecuatoriana**. Escuela Superior Politécnica Del Litoral Facultad De Ciencias Naturales Y Matemáticas. Equador, 2017. Disponível em: <http://www.dspace.espol.edu.ec/xmlui/handle/123456789/42559>.

JAEGER, K.-E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial Biocatalysts: **Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases**. Annual Review of Microbiology, v. 53, n. 1, p. 315–351, out. 1999. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10547694/>>.

LOWRY, O. H. *et al.* **Protein measurement with the folin phenol reagent**. The Journal of biological chemistry vol. 193,1: 265-75. Departamento de Farmacologia, Universidade de Washington, Escola de Medicina, St. Louis, Missouri, 1951. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14907713/>>

MCMURRY, John. **Química Orgânica - Volume 2: Tradução da 9ª edição norte-americana**. Cengage Learning Brasil, 2016. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788522125319/>.

MESQUITA, M. V. N.; NUNES, D. B.; RIBEIRO, B. **Imobilização enzimática em matrizes poliméricas**. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal do Piauí. Boletim Informativo Geum v. 9, n. 2, p. 38-50, 2018. Disponível em: <<https://revistas.ufpi.br/index.php/geum/article/view/6810/4881>>.

MIRANDA, R. A. de; DUARTE, J. de O.; GARCIA, J. C.; DURAES, F. O. M. **Sustentabilidade da cadeia produtiva do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2021. 27 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Documentos, 261). Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/223515/1/Doc-261.pdf>>.

MONTEIRO, J. L. DOS S.; CRUZ, T. C. DA; CASTRO, A. DE O. **Synthesis of grafite from amazonian residual biomass**. Journal of Engineering and Technology for Industrial Applications, v. 5, n. 19, 2019. Disponível em: <<https://itegam-jetia.org/journal/index.php/jetia/article/view/504>>.

MOTA, R. S.; OLIVEIRA, I. V.; SANTOS NETO, J. P.; CARVALHO, F. I. M.; SILVA, P. A. Produção e aceitabilidade de suco composto: uma alternativa tecnológica para a cadeia produtiva do milho. Natural Resources, v.10, n.2, p.1-10, 2020. Disponível em: <<http://doi.org/10.6008/CBPC2237-9290.2020.002.0001>>.

NEMATIAN, T. et al. **Lipase immobilized on functionalized superparamagnetic few-layer graphene oxide as an efficient nanobiocatalyst for biodiesel production from Chlorella vulgaris bio-oil**. **Biotechnology for Biofuels**, v. 13, n. 1, p. 57, 2020. Disponível em: <<https://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13068-020-01688-x>>.

PEREIRA, M. B. **Imobilização de biocatalisadores para hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2019. Disponível em: <<http://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/9346>>.

PINTO, F. T. R. **Obtenção de álcoois e ésteres quirais utilizando lipases e resolução cinética enzimática da ketamina e análogos**. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018. Disponível em: <<https://repositorio.ufc.br/handle/riufc/34940>>.

PINTO, G. C. **Óxido de grafeno magnético: uma estratégia para imobilização de lipases**. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, 2019. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/180901>>.

QUAYSON, E. et al. **Immobilized lipases for biodiesel production: Current and future greening opportunities**. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 134, p. 110355, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1364032120306432>>.

REIS, E. A. dos. **Estudo da influência de nanopartículas de ouro na atividade de lipase de Pseudomonas fluorescens imobilizada em nanopartículas superparamagnéticas**. 2020. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2020. Disponível em: <<https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/13039>>.

SANKAR, S. et al. **Ultrathin graphene nanosheets derived from rice husks for sustainable supercapacitor electrodes**. New Journal of Chemistry, v. 41, n. 22, p. 13792–13797, 2017. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2017/nj/c7nj03136j/unauth>>.

SANTOS, C. I. A. DOS; SALGADO, C. A.; VANETTI, M. C. D. **Lipases bacterianas: impactos na qualidade de produtos lácteos e potencial biotecnológico**. Research, Society and Development, v. 10, n. 13, 2021. Disponível em: <[https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/download/21213/18851/255750#:~:text=Lipases%20derivadas%20de%20bact%C3%A9rias%20psicotr%C3%B3ficas,et%20al.%2C%202021\).>](https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/download/21213/18851/255750#:~:text=Lipases%20derivadas%20de%20bact%C3%A9rias%20psicotr%C3%B3ficas,et%20al.%2C%202021).>)

SANTOS-ROCHA, M. S. R. et al. **Pré-tratamento hidrotérmico de resíduos do milho visando à produção de etanol de segunda geração**. Scientia Plena, p. 13, 2017. Disponível em: <<https://www.scientiaplenua.org.br/sp/article/view/3404/1682>>

SARMAH et al. **Recent advances on sources and industrial applications of lipases**. Biotechnology progress vol. 34,1 (2018): 5-28. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29086509/>>.

SHAO, Y. et al. **Graphene oxide-based Fe₃O₄ nanoparticles as a novel scaffold for the immobilization of porcine pancreatic lipase**. RSC Advances, v. 5, n. 126, p. 103943–103955, 2015. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2015/ra/c5ra19276e>>.

SILVA, T. A. DA C. E. **Produção e imobilização de lipases produzidas pelo fungo endofítico *Cercospora kikuchii* para aplicações biotecnológicas**. Doutorado em Medicamentos e Cosméticos—Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 16 abr. 2014. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2015/ra/c5ra19276e>>.

SILVA, T. N. **Caracterização agrônômica e morfológica de populações de milho**. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014. Disponível em: <<https://hdl.handle.net/11449/110317>>.

SOUZA, L. T. DE A. et al. **Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte**. Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria - Vol. 4. 1. Editora Blucher, 2017. p. 529–568. Disponível em: <<https://openaccess.blucher.com.br/article-details/imobilizacao-enzimatica-principios-fundamentais-e-tipos-de-suporte-20266>>.

SUD, D.; MAHAJAN, G.; KAUR, M. **Agricultural waste material as potential adsorbent for sequestering heavy metal ions from aqueous solutions – A review**. Bioresource Technology, v. 99, n. 14, p. 6017–6027, 2008. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852407010024>>.

TANIGUCHI, E. T. **Avaliação da invertase imobilizada em resíduo agroindustrial para aplicação em reatores enzimáticos de alta taxa**. p. 86, 2017. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/152662>>.

ZDARTA, J. et al. **A General Overview of Support Materials for Enzyme Immobilization: Characteristics, Properties, Practical Utility**. Catalysts, v. 8, n. 2, p. 92, 24, 2018. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2073-4344/8/2/92>>.